



**ELISABETE CRISTINA CORDEIRO MORAIS ESTUDO DAS ALTERAÇÕES LIPÍDICAS INDUZIDAS
POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**STUDY OF LIPID CHANGES INDUCED BY SILVER
NANOPARTICLES**



**ELISABETE CRISTINA
CORDEIRO MORAIS**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES LIPÍDICAS INDUZIDAS
POR NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**STUDY OF LIPID CHANGES INDUCED BY SILVER
NANOPARTICLES**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, Ramo de Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica da Doutora Iola Melissa Fernandes Duarte, Investigadora Auxiliar do Laboratório Associado CICECO, Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Domingues, Professora Auxiliar com Agregação, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) - projetos FCT/PTDC/SAU-TOX/120953/2010, FCOMP-01-0124-FEDER-037271 (Ref. FCT PEst-C/CTM/LA0011/2013) e QOPNA (Ref. FCT PEst-C/QUI/UI0062/2013) financiados pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Fatores de Competitividade (COMPETE); da Universidade de Aveiro - Centro de Investigação em Materiais Cerâmicos e Compósitos (CICECO) e Unidade de Investigação em Química orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares (QOPNA). Também se agradece à Rede Nacional de Espectrometria de Massa (RNEM).



Dedico este trabalho à minha família, em especial à memória do meu irmão Sérgio.

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Luísa Daniel da Silva

Investigadora Auxiliar do Laboratório Associado CICECO, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Iola Melissa Fernandes Duarte

Investigadora Auxiliar do Laboratório Associado CICECO, Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Neste momento tenho a agradecer a todos os que já cruzaram o meu caminho, quer académico quer pessoal.

Deixo um agradecimento especial às minhas orientadoras neste projeto, Doutora Iola Duarte e Doutora Rosário Domingues, por todo o conhecimento transmitido, bem como o apoio dado ao longo deste projeto.

Agradeço ainda a todos os elementos do grupo de espectrometria de massa do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e aos restantes colaboradores do projeto FCT/PTDC/SAU-TOX/120953/2010, que sempre revelaram disponibilidade e prontidão para me ajudarem na execução deste trabalho.

Não posso deixar de agradecer aos meus companheiros de mestrado pela partilha de momentos de reflexão e pela boa disposição.

Finalmente, não posso deixar de agradecer a minha família pelo pilar basilar que é na minha vida.

A todos, um MUITO OBRIGADA!

palavras-chave

nanopartículas de prata, peroxidação lipídica, perfil fosfolipídico, peróxido de hidrogénio, lipossomas, hidroperóxidos lipídicos, espectrometria de massa

resumo

Face à ampla disseminação das nanopartículas de prata (Ag-NPs) em produtos de uso comum e ao seu enorme potencial de desenvolvimento em novas aplicações médicas, é essencial avaliar de forma cuidada e rigorosa as respostas biológicas a estas nanopartículas (NPs). O *stress* oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas de toxicidade das Ag-NPs para as células humanas, sendo que a oxidação dos lípidos membranares constitui um evento importante desse processo. No presente trabalho, a peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs foi avaliada num sistema lipossómico de fosfatidilcolinas (mimético das membranas celulares) e em queratinócios da pele humana (linha celular HaCaT), tendo em conta que a pele é uma das principais vias de entrada de Ag-NPs no organismo. As Ag-NPs testadas, de origem comercial, variaram no revestimento (citrato ou polietileno glicol – PEG) e no tamanho (10 e 30 nm). Os lipossomas constituídos por DMPC (lípidio saturado) e PLPC (lípidio insaturado) foram incubados na presença de Ag-NPs, em diferentes condições oxidativas (presença/ausência de peróxido de hidrogénio, H_2O_2), com o intuito de: 1) quantificar a formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) através do método de FOX II, 2) avaliar a extensão de oxidação da PLPC recorrendo à análise por espectrometria de massa (MS). Os resultados obtidos mostraram que a oxidação da PLPC apenas ocorreu de forma significativa na presença H_2O_2 , como comprovado pelo aumento dos níveis de LOOH, aumento da razão $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$ e identificação de produtos de oxidação da PLPC nos espectros de MALDI-MS. As Ag-NPs Cit30 e PEG10 mostraram uma dependência diretamente proporcional entre a concentração usada e a razão de $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$, sendo que o mesmo não se verificou para as NPs PEG30. Da exposição das células HaCaT às mesmas Ag-NPs, apenas resultou peroxidação lipídica no caso das NPs Cit30. Para além disso, avaliaram-se as abundâncias relativas de diferentes classes de fosfolípidos (separadas por TLC) nas células expostas a Ag-NPs e a prata iónica, mas não se registaram alterações significativas, apenas algumas tendências de variação, como por exemplo uma diminuição do teor de cardiolipinas aquando da incubação com NPs Cit30 durante 24 horas.

keywords

silver nanoparticles, lipid peroxidation, phospholipid profile, hydrogen peroxide, lipid hydroperoxides, liposomes, mass spectrometry

abstract

Due to the widespread use of silver nanoparticles (Ag-NPs) in common products and their prospective new biomedical applications, it is fundamental to assess, in a rigorous way, the biological responses to these nanoparticles (NPs). Oxidative stress has been implicated as a major cause of Ag-NPs toxicity to human cells, and lipid oxidation occurring in cell membranes may possibly play a key role in this process. In the present work, the lipid peroxidation induced by Ag-NPs was assessed in liposomes of phosphatidylcholines (to mimic cellular membranes), and also in keratinocytes (HaCaT cells), because skin is one of the main entry routes of Ag-NPs in the organism. The Ag-NPs tested were from commercial origin and presented different coatings (citrate and polyethyleneglycol-PEG) and sizes (10 and 30 nm). The liposomes composed of DMPC (saturated lipid) and PLPC (unsaturated lipid) were incubated in the presence of Ag-NPs in different oxidative conditions (absence/presence of hydrogen peroxide, H_2O_2), in order to: 1) quantify lipid hydroperoxides (LOOH) via the FOX II assay; 2) assess the extent of oxidation by mass spectrometry (MS). The results obtained showed that oxidation of PLPC only occurred at significantly extent in the presence of H_2O_2 , as evidenced by the increase in LOOH levels, increased ratio $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$ and the identification of PLPC oxidation products in MALDI-MS spectra. The PLPC oxidation induced by Ag-NPs Cit30 and PEG10 in the presence of H_2O_2 showed a direct correlation with NPs concentration, the same not being observed for Ag-NPs PEG30. A trend for lipid peroxidation was also observed in HaCaT cells exposed to Ag-NPs Cit30. Furthermore, the relative abundance of lipid classes (separated by TLC) was assessed in cells exposed to Ag-NPs and ionic silver. Although no significant variations were observed, there were some trend for alterations such as a decrease in the content of cardiolipin when the cells were incubated in the presence of Ag-NPs Cit30 by 24 hours.

Índice Geral

Índice de figuras	III
Índice de tabelas	VI
Abreviaturas & Símbolos	VII

Capítulo I – Introdução

I.1. Nanopartículas de prata	3
I 1.1. Propriedades gerais	3
I 1.2. Atividade antibacteriana	7
I 1.3. Toxicidade de Ag-NPs em células humanas	9
I.2. Stress oxidativo e modificações lipídicas	11
I.3. Métodos para a avaliação das modificações lipídicas induzidas por stress oxidativo	15
I 3.1. Produtos de oxidação lipídica	16
I 3.2. Perfil lipídico	19
I.4. Alterações lipídicas induzidas por nanopartículas de prata	20
I.5. Objetivos do trabalho	22

Capítulo II – Materiais e métodos

II.1. Reagentes	27
II.2. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em sistema lipossômico.....	28
II.2.1. Formação dos lipossomas de fosfatidilcolinas	28
II.2.2. Oxidação de fosfolípidos presentes no lipossoma induzida pelo radical hidroxilo formado pela reação de Fenton	28
II.2.3. Incubação de lipossomas com Ag-NP na ausência e presença de H ₂ O ₂	29
II.2.4. Extração lipídica de lipossomas	29
II.2.5. Avaliação da peroxidação lipídica	30
II.2.6. Análise estatística	30
II.3. Alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs em queratinócitos humanos	31
II.3.1. Exposição de células HaCaT a Ag-NPs	31
II.3.2. Obtenção do extrato lipídico total das células HaCaT	31
II.3.3. Estimativa da quantidade de fosfolípidos nos estratos lipídicos totais	32

II.3.4. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos	32
II.3.5. Quantificação de dienos conjugados	33
II.3.6. Separação de classes de lípidos por cromatografia em camada fina	33
II.3.7. Análise estatística	33
 Capítulo III - Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs lipossomas	
III.1. Otimização dos métodos usados avaliar a peroxidação lipídica em lipossomas	37
III.2. Estudo da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs	43
III.2.1. Efeito das Ag-NPs Cit30	44
III.2.2. Efeito das Ag-NPs PEG30	45
III.2.3. Efeito das Ag-NPs PEG10	49
III.2.4. Comparação das diferentes Ag-NPs testadas	51
III.3. Discussão	53
 Capítulo IV – Alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs em queratinócitos humanos	
IV.1. Avaliação da peroxidação lipídica em queratinócitos	61
IV.2. Perfil fosfolipídico de queratinócitos expostos a Ag-NPs	64
IV.3. Discussão	67
 Capítulo V – Conclusões gerais e perspectivas futuras	
Referências	
75	

Índice de figuras

Capítulo I – Introdução

Figura I.1. Número de publicações, por ano, na base de dados “Web of Science” que contêm os termos de pesquisa: “silver nanoparticle”	3
Figura I.2. Nanopartículas de prata de vários tamanhos e formas	5
Figura I.3. Espectro de extinção de Ag-NPs com tamanho de 50 nm após a adição de carbonato de sódio (20 nM) em solução aquosa	6
Figura I.4. Diferenças estruturais na parede celular de bactérias: gram-negativas (A) e gram-positivas (B)	7
Figura I.5. Mecanismo de ação antibacteriano de Ag-NPs	8
Figura I.6. Mecanismo de toxicidade de Ag-NPs para células eucarióticas humanas	11
Figura I.7. Mecanismo de peroxidação lipídica	13
Figura I.8. Produtos secundários de peroxidação lipídica, via formação dos radicais peróxido e alcoxi, LOO• e LO•	15

Capítulo III - Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em lipossomas

Figura III.1. Comportamento das Ag-NPs, Cit30 e PEG30, em clorofórmio	38
Figura III.2. Aspecto visual das reações controle (lipossomas na ausência de Ag-NPs), Cit30 (lipossomas + 10 µg/mL de Cit30) e PEG30 (lipossomas + 10 µg/mL de PEG30) antes (A) e após centrifugação - 20000 g, 1 hora a 4°C (B). C - Espectro FTIR dos pellets obtidos após centrifugação em Cit30 e PEG30. D - Espectro de UV-Visível da fase orgânica das reações controle, Cit30 e PEG30	39
Figura III.3. Estrutura química da: A - 1,2-dimeristóil-sn-glicero-3-fosfolina (DMPC); B - e da 1-palmitóil-2-linoleoil-3-fosfolina (PLPC)	41
Figura III.4. Espectro de massa obtidos por MALDI-MS do controle e da reação de Fenton às 24 horas de incubação, A e B, respectivamente	42
Figura III.5. Espectro de UV-Vis de lipossomas incubados na presença de H ₂ O ₂ (50 mM) e de Cit30 (40 µg/mL), imediatamente após a adição do último reagente (Cit30) - 0 minutos e após de 10 minutos de incubação	43
Figura III.6. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs de 30 nm revestidas com citrato (Cit30)	45

Figura III.7. Espectros de MALDI-MS obtidos para as fases orgânicas resultantes da incubação de lipossomas com CIT30 na ausência e na presença de H ₂ O ₂ durante 24 horas	47
Figura III.8. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs de 30 nm revestidas com polietileno de glicol (PEG30)	49
Figura III.9. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs de 10 nm revestidas com polietileno de glicol (PEG10)	50
Figura III.10. Comparação das diferentes Ag-NPs testadas (Cit30 vs. PEG30 vs. PEG10) na peroxidação lipídica	52

Capítulo IV – Alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs em queratinócitos humanos

Figura IV.1. Teor de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em células HaCaT controlo (sem NPs) e células expostas a Ag-NPs revestidas a citrato (Cit30) durante 24 e 48 horas	61
Figura IV.2. Teor de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em células HaCaT controlo e células expostas a AgNO ₃ durante 24 e 48 horas	62
Figura IV.3. Teor de A) hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e de B) dienos conjugados (DC) em células HaCaT controlo (sem NPs) e células expostas a Ag-NPs durante 24 horas (10 e 40 µg/mL)	63
Figura IV.4. Teor de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em células HaCaT controlo (sem NPs) e células expostas a Ag-NPs Cit30 e PEG30 durante 24 horas.	64
Figura IV.5. TLC representativo de extratos lipídicos de células HaCaT sem exposição a AgNPs (C) e com exposição a 10 µg/mL de Ag-NPs revestidas com citrato (Cit30) e polietenoglicol (PEG30).	65
Figura IV.6. Conteúdo relativo de fosfolípidos (%) separados por cromatografia em camada fina (TLC) de extratos lipídicos de células HaCaT expostas a 10 µg/mL de Ag-NPs revestidas com citrato (Cit30) e polietenoglicol (PEG30) durante um período de incubação de 24 horas	66
Figura IV.7. Conteúdo relativo de fosfolípidos (%) separados por cromatografia em camada fina (TLC) de extratos lipídicos de células HaCaT expostas a 10 µg/mL de Ag-NPs revestidas com citrato (Cit30) durante 48 horas	67

Figura IV.8. Conteúdo relativo de fosfolípidos (%) separados por cromatografia em camada fina (TLC) de extratos lipídicos de células HaCaT expostas a AgNO_3 (0, 0.6 e 1.2 $\mu\text{g/mL}$) durante os períodos de incubação: A) 24 horas e B) 48 horas68

Índice de tabelas

Capítulo I – Introdução

Tabela I.1. Metodologias frequentes usadas para a quantificação dos produtos obtidos por peroxidação lipídica	19
Tabela I.2. Estudos realizados em sistemas biomiméticos lipídicos, lipossomas, para o estudo de interações entre membranas lipídicas e nanopartículas de prata	21

Capítulo II – Materiais e métodos

Tabela II.1. Propriedades das Ag-NPs usadas neste trabalho	27
Tabela II.2. Volumes de tampão de hidrogenocarbonato de amónia (5 mM, pH 7.4), solução de peróxido de hidrogénio (500 mM) e solução de Ag-NPs (1mg/mL) adicionado em cada ensaio	29

Capítulo III - Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em lipossomas

Tabela III.1. Efeito de Ag-NPs na peroxidação lipídica	46
--	----

Abreviaturas & Símbolos

Ag-NPs – nanopartículas de prata

Cit30 – nanopartículas de prata com diâmetro de 30 nm revestidas a citrato

CL – cardiolipina

DC – dienos conjugados

DLS – dispersão dinâmica de luz

DMPC – dimiristoil fosfatidilcolina ou 1,2-dimeristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina

DMPG – dimiristoil fosfatidilglicerol

DPPC – dipalmitoil fosfatidilcolina

ESI-MS – espectrometria de massa com ionização por electrospray

FTIR – espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

GC – cromatografia em fase gasosa

GC-MS – cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa

HNE – 4-hidroxo-2-nonenal

HO• – radical hidroxilo

HPLC – cromatografia líquida de alto desempenho

HPLC-MS – cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa

HSA – albumina de soro humana

IC₅₀ – concentração inibitória

L• – radical lipídico

LH – lípido polinsaturado

LO• – radical lipídicos alcoxi

LOO• – radical peroxilo lipídico

LOOH – hidroperóxido lipídico

m/z – razão massa carga

MALDI - ionização e dessorção por laser assistida por matriz

MDA – aldeído malónico

Meⁿ – metal de transição

MS – espectrometria de massa

NPs – nanopartículas

O_2^- – radical superóxido (O_2^-)
OX - laranja de xilenol
PC – fosfatidilcolinas
PE – fosfatidiletanolaminas
PEG10 – nanopartículas de prata com diâmetro de 10 nm revestidas com polietileno glicol
PEG30 – nanopartículas de prata com diâmetro de 30 nm revestidas com polietileno glicol
PI – fosfatidilinositol
PLs – fosfolípidos
PLPC – 1-palmitoil-2-linoleoil-3-fosfocolina
PS – fosfatidilserina
PV – valor de peróxidos
PVP – polivinilpirrolidona
 R^\bullet - radical livre
RMN – espectroscopia de ressonância magnética nuclear
RNS – espécies reativas de azoto
ROS – espécies reativas de oxigénio
SM – esfingomiéline
SPR – ressonância de plasmão de superfície
TBA – ácido tiobarbitúrico
TBARS – espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico
TEM – microscopia eletrónica de transmissão
TLC – cromatografia em camada fina
TPP – trifenilfosfina
TPPO – óxido de trifenilfosfina

Capítulo I – Introdução

I.1. Nanopartículas de prata

I.1.1. Propriedades gerais

As nanopartículas (NPs) são agregados de átomos com dimensões compreendidas entre 1 e 100 nm e podem ser constituídas por diferentes materiais, como metais, óxidos de metais, polímeros ou carbono (1). Entre os vários tipos de NPs disponíveis atualmente no mercado mundial, as nanopartículas de prata (Ag-NPs) são as mais disseminadas, encontrando-se em mais de um terço dos produtos comercializados contendo NPs (2). Na última década, o interesse em Ag-NPs tem aumentado, como é possível observar pelo aumento exponencial do número de artigos publicados com as palavras “silver nanoparticle” (Figura I.1.). A disseminação do uso de Ag-NPs em produtos do uso comum (têxteis, embalagens alimentares, tintas) e em produtos biomédicos (pomadas e pensos para queimados, equipamento médico, implantes) deve-se às suas propriedades únicas e distintas do material em bruto (1,3), e ainda ao seu efeito antimicrobiano, comum à prata (4). No entanto, vários estudos têm sugerido que Ag-NPs podem apresentar toxicidade para células humanas, fazendo crescer a preocupação relativamente ao seu uso no quotidiano (2,5–8). Neste sentido, é necessário desenvolver esforços na investigação das respostas biológicas às Ag-NPs, tanto para a compreensão do seu efeito antimicrobiano como para avaliar o seu potencial mecanismo de toxicidade.

O leque de aplicações de Ag-NPs é vasto, passando pela indústria têxtil, alimentar, até à produção de tintas e de biossensores, sendo de esperar que estas aplicações se

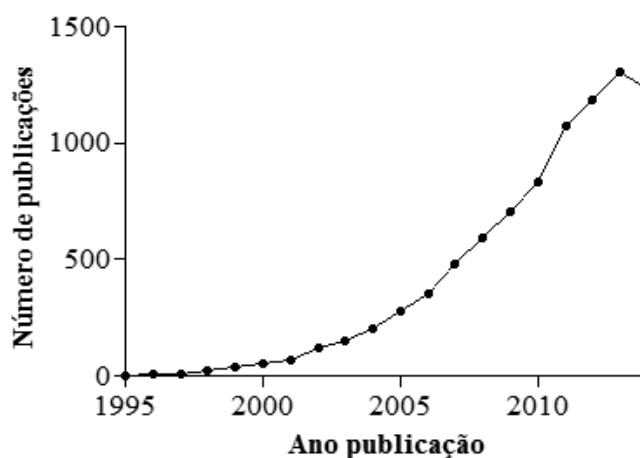


Figura I.1. Número de publicações, por ano, na base de dados “Web of Science” que contém os termos de pesquisa: “silver nanoparticle”. Atualizado a 25/11/14.

diversifiquem ainda mais, face às inúmeras possibilidades de manipulação das propriedades das Ag-NPs aquando a sua síntese (9–11). Em particular, as Ag-NPs apresentam grande potencial na área da medicina (2,3,6,10). Este potencial deve-se primeiramente à semelhança entre o tamanho das Ag-NPs e dos organelos celulares e biomoléculas. Por outro lado há ainda a destacar o efeito antibacteriano das Ag-NPs (3,4,12,13), de elevada importância face ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos usados comumente no tratamento de infeções bacterianas (14); e ainda devido à razão elevada entre área superficial e volume das NPs, que contribui para a reatividade das Ag-NPs (13).

As Ag-NPs podem ser sintetizadas por organismos (bactérias, plantas e fungos) ou obtidas em laboratório, por via química ou física, sendo a primeira via a mais usada (11,15). Neste processo de síntese, de forma geral, os iões de prata (Ag^+) são reduzidos a prata metálica (Ag^0) (Equação I.1) por ação de agentes redutores, como citrato de sódio, ascorbato e boro-hidreto de sódio, podendo o meio reacional ser aquoso ou orgânico.



Dependendo do processo de síntese, as Ag-NPs apresentarão propriedades físico-químicas diferentes, por exemplo, ao nível do tamanho, forma, revestimento e carga superficial (11). Todas estas propriedades e as suas possíveis alterações em meio biológico poderão ter grande influência nas interações com células e biomoléculas, sendo assim determinantes para as respostas biológicas às Ag-NPs. Para a caracterização destas propriedades químicas e físicas podem ser usados vários métodos, incluindo, entre outros, técnicas microscópicas e métodos espectroscópicos. As técnicas de microscopia eletrónica de transmissão (TEM), dispersão dinâmica de luz (DLS) e espectroscopia de UV-visível são as mais usadas para a caracterização de Ag-NPs (revisto em(2)).

As imagens obtidas por TEM permitem quantificar o tamanho médio das NPs (contagem por tamanho), e visualizar a sua forma, que, como se mostra na Figura I.2., pode ser bastante variável (16). A análise das soluções de Ag-NPs por DLS permite a obtenção de dois parâmetros: o tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta. O primeiro reflete o tamanho da NP solvatada em solução, sendo geralmente maior do que o tamanho nominal

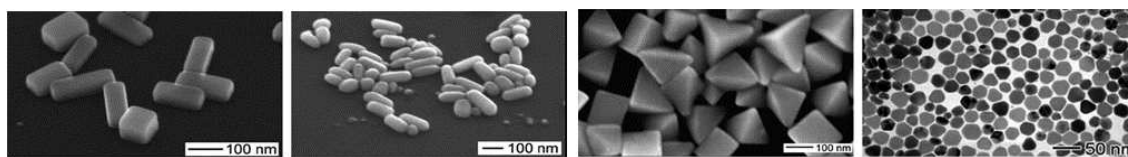


Figura I.2. Nanopartículas de prata de vários tamanhos e formas. Adaptado de (16)

obtido por TEM. O segundo parâmetro reflete a carga à superfície das Ag-NP (2). A espectroscopia de UV-Vis é também muito útil pois permite confirmar a presença de Ag-NPs em solução, através da observação de uma banda com máximo de absorvância perto de 400 nm, correspondente à ressonância de plasmão de superfície (SPR) (2,17). Esta propriedade, típica de NPs metálicas, resulta da oscilação coletiva dos elétrons à superfície da NP, estabelecendo-se a condição de ressonância quando a frequência da luz incidente e a frequência dos elétrons que oscilam se igualam (18,19). No caso das Ag-NPs, essa frequência encontra-se na zona visível do espectro eletromagnético, o que confere às soluções de Ag-NPs colorações variadas. A cor é dependente do tamanho e forma da NP, bem como das propriedades físico-químicas do meio (2).

As NPs formadas podem apresentar alguma instabilidade, dependendo do meio em que se encontram, pelo que é comum a adição de reagentes que as estabilizem, revestindo-as e evitando a sua agregação (20). Os agentes de revestimento podem ser os próprios agentes redutores usados no processo de síntese (ex. citrato) ou outras moléculas como polímeros e proteínas (11,15). Esta escolha deve ser realizada tendo em conta o uso posterior a dar às Ag-NPs sintetizadas, já que o revestimento das NPs poderá conferir-lhes novas propriedades físico-químicas que potenciem ou inibam determinado efeito biológico (21). Em particular, diferentes revestimentos poderão traduzir-se em alteração do tamanho (hidrodinâmico), da razão área superficial/volume, da forma e da carga superficial das Ag-NPs.

Quando colocadas num meio diferente daquele em que se encontram estáveis, por exemplo em meio de cultura celular (meio biológico), as Ag-NPs poderão sofrer várias alterações (22,23), como agregação, revestimento por proteínas presentes em solução (formação de “corona” proteica) (24) e dissociação com libertação de prata iónica (25,26).

A agregação de Ag-NPs resulta da alteração das interações que mantinham as NPs dispersas em solução, por exemplo, devido a variações de pH ou da força iónica, levando à formação de agregados com maior tamanho do que as partículas individuais (22,24).

Implicando uma alteração das propriedades óticas das partículas, este processo pode ser seguido por UV-Vis, como se ilustra na figura I.3. No exemplo dado, observa-se, ao longo do tempo após a adição de carbonato de sódio (aumento da força iónica), a diminuição da intensidade do pico de absorção a ~ 400 nm e o surgimento de um pico largo e de intensidade menor entre os 600 - 700 nm, correspondente às Ag-NP agregadas.

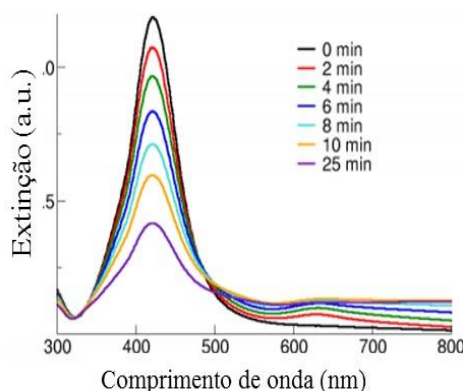


Figura I.3. Espectro de extinção de Ag-NPs com tamanho de 50 nm após a adição de carbonato de sódio (20 nM) em solução aquosa. Adaptado de www.nanocomposix.eu

O revestimento das Ag-NPs por proteínas presentes no meio (por exemplo, albumina humana ou bovina, frequentemente usadas nos meios de cultura celular) também altera as propriedades físico-químicas das partículas (24). Esta “corona” proteica resulta de interações electrostáticas, forças Van der Waals e pontes de hidrogénio das moléculas à superfície das Ag-NPs e as proteínas, podendo resultar na estabilização das NPs e influenciar os seus efeitos biológicos, quer por via das suas propriedades alteradas (ex. tamanho e carga superficial) quer pela ativação/inativação de recetores específicos da proteína (24).

A libertação de iões de prata das Ag-NPs para o meio (favorecida em condições acídicas) (26) é muitas vezes mencionada como responsável pelo efeito biológico observado, embora não havendo consenso sobre se os iões libertados têm uma ação ativa ou passiva (2). A velocidade de libertação de Ag^+ para o meio depende da área superficial disponível das Ag-NPs e de fatores ambientais, tais como a temperatura, o pH e a concentração de oxigénio na solução (25,26). A dissolução da camada de óxido de prata à superfície da NP, favorecida por exemplo pela presença de sais em solução, poderá estar na origem desta libertação de prata iónica (20).

Tem sido sugerido que durante este processo ocorre a formação de produtos intermediários, peróxidos, que são libertados para o meio reacional (26). A ação destes peróxidos potencia o aumento de iões libertados, o que permite inferir que o processo de libertação de Ag^+ para o meio é autossustentável, uma vez iniciado. Desta forma a libertação de Ag^+ das Ag-NPs para o meio ocorre inicialmente a uma velocidade mais lenta, e à medida que se formam peróxidos, a quantidade de Ag^+ libertada para o meio aumenta de forma mais rápida (26).

I.1.2. Atividade antibacteriana

A atividade antimicrobiana, em particular bactericida, das Ag-NPs está na origem da sua crescente incorporação em produtos de uso comum e da exploração de novas aplicações biomédicas (3). Apesar deste efeito antibacteriano ser amplamente conhecido, não existe consenso sobre o mecanismo pelo qual as Ag-NPs são responsáveis pela morte e inibição do crescimento de bactérias, por exemplo se o seu efeito se deve apenas à interação das NPs, aos iões Ag^+ que se libertam para o meio ou ao efeito sinérgico entre estes (2,4,6,12–14,27,28).

Diferentes bactérias apresentam também diferente suscetibilidade quando expostas a Ag-NPs, sendo que as gram-positivas parecem oferecer uma maior resistência (12). As diferenças estruturais ao nível da parede celular entre bactérias gram-positivas e gram-negativas poderão estar na origem desta observação, já que as primeiras apresentam uma parede celular com uma camada espessa de peptidoglicano, que poderá funcionar como escudo protetor (Figura I.4.). Uma vez atravessada a parede celular bacteriana, o mecanismo de ação das Ag-NPs deverá ser semelhante (2,6,28).

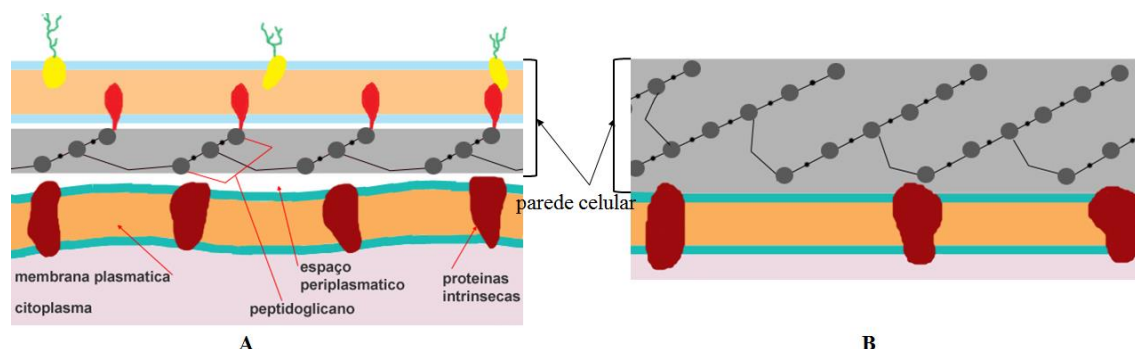


Figura I.4. Diferenças estruturais na parede celular de bactérias: gram-negativas (A) e gram-positivas (B). Adaptado de <http://materiais.dbio.uevora.pt>

A Figura I.5. representa de forma esquemática os processos envolvidos no mecanismo proposto para a de ação das Ag-NPs em bactérias (29). Inicialmente ocorre a concentração de NPs à superfície da membrana plasmática, o que provoca alteração das propriedades desta membrana permitindo a entrada de Ag-NPs na bactéria. As NPs de menor dimensão apresentam uma elevada razão área superficial/ volume permitindo o

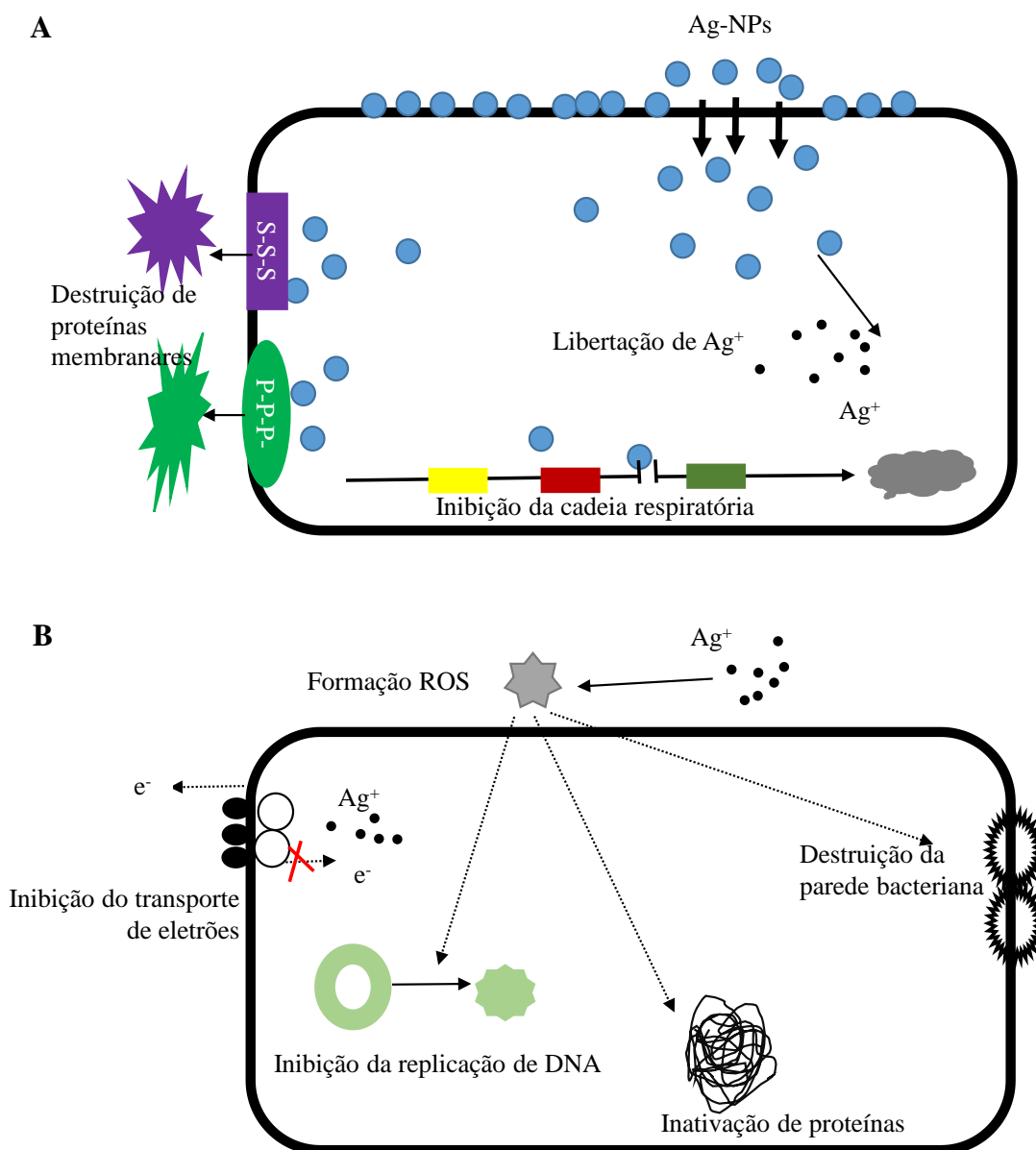


Figura I.5. Mecanismo de ação antibacteriano de Ag-NPs. Após a entrada das NPs na bactéria estas apresentam a capacidade de se ligarem a proteínas e DNA, resultando na inibição da cadeia respiratória, inibição da replicação de DNA e na inativação de proteínas (A). O processo de libertação de Ag⁺ é responsável pela produção ROS, que potencia a atividade antibacteriana (B). Adaptado de (29)

estabelecimento de interações suficientemente fortes capazes de alterar a estrutura e permeabilidade membranar (29). Estas alterações são responsáveis pela entrada das Ag-NPs na bactéria, e contribuem também para o dano na membrana com consequente morte da bactéria. Já dentro da célula bacteriana, as Ag-NPs podem interagir com proteínas e DNA devido à elevada afinidade para o estabelecimento de interações entre a prata presente nas NPs e os grupos sulfato e tiol presentes nas moléculas referidas (4,30). Desta interação resulta alteração estrutural/funcional de proteínas e DNA levando consequentemente à morte da bactéria.

O processo de libertação de Ag^+ pelas Ag-NPs também desempenha um papel importante (31). A nível interno, a prata iónica (Ag^+) é capaz de inibir enzimas vitais para o metabolismo da bactéria, nomeadamente as da cadeia respiratória (32). A libertação de Ag^+ é um processo autossustentado a nível bacteriano, que provoca condições de *stress* oxidativo (produção de espécies reativas de oxigénio, ROS) para as bactérias. Estas condições oxidativas são responsáveis pela inativação da replicação de DNA, inativação de proteínas e ainda pela destruição da membrana bacteriana que culmina com a inibição do crescimento bacteriano, resultando num aumento do potencial do efeito antibacteriano provocado pelas próprias Ag-NPs, como revisto por vários autores (2,4,6,12–14,27,28).

I.1.3. Toxicidade de Ag-NPs em células humanas

O crescente uso de Ag-NPs nas mais diversas aplicações motivou o estudo dos seus possíveis efeitos tóxicos, agudos e crónicos, para as células humanas. As principais linhas celulares que têm sido usadas em testes *in vitro* de toxicidade de Ag-NPs são queratinócitos da pele, células pulmonares, macrófagos e células do fígado (2,33). O uso deste tipo de modelos celulares reside no facto da exposição às NPs se dar, principalmente, por contacto direto com a pele e por inalação (com consequente acumulação nos pulmões). Depois, uma vez na corrente sanguínea, as NPs podem entrar em contacto com macrófagos, que constituem a primeira linha de defesa a substâncias estranhas ao organismo, e acumular-se em vários órgãos, preferencialmente no fígado.

A avaliação da viabilidade celular, em função da exposição a diferentes concentrações de NPs, é um dos principais métodos usados para estudar a toxicidade das NPs em modelos celulares. No caso das Ag-NPs, verificou-se que o efeito na viabilidade celular, traduzido pelo valor de IC_{50} (concentração que reduz em 50% a viabilidade celular)

é bastante dependente da dose aplicada, do tempo de exposição, modelo celular, e das características das Ag-NPs (tamanho, forma e revestimento). Assim, devido às diferentes condições experimentais usadas nos diversos ensaios publicados, os valores de IC₅₀ descritos na literatura são muito variáveis, embora a sua ordem de grandeza ronde tipicamente concentrações micromolares, como revisto em revisto em (14).

Observações feitas por TEM indicam a presença de Ag-NPs em diversos locais de células eucariotas: 1) no citoplasma, na forma de alguns agregados e em maior quantidade na sua forma livre (7,34); 2) no núcleo, apenas na sua forma livre, e em menor concentração (7,34); 3) em endossomas, perto da membrana plasmática (34). Estas evidências mostram que a entrada das NPs na célula pode ocorrer por fagocitose no caso de agregados (7), ou por endocitose no caso de NPs não agregadas, indicando que o tamanho condiciona fortemente o “uptake” celular (35). Para além disso, a concentração de Ag-NPs em volta da membrana celular pode provocar a ativação de recetores membranares e a alteração da permeabilidade da membrana (4,36,37). As interações com a membrana podem ser de natureza electrostática ou basear-se na possível reatividade entre as Ag-NPs ou os iões Ag⁺ com os grupos tiol (SH) em recetores proteicos membranares, favorecidas pela elevada afinidade da prata para compostos com enxofre (S). Estas possíveis interações podem ser responsáveis pela inativação e/ou ativação de eventos bioquímicos que conduzem à morte celular (38,39).

Embora, o mecanismo de toxicidade das Ag-NPs para as células humanas não se encontre completamente conhecido, os resultados dos diversos estudos permitiram propor alguns aspetos chave, esquematizados representados na Figura I.6 (40). Uma vez dentro da célula, as Ag-NPs (e/ou os iões Ag⁺) podem provocar a inibição da cadeia respiratória, destruindo o fluxo de prótons responsável pela produção de ATP (14,34). Para além da redução na produção de ATP e consequente inibição de vias dependentes de ATP, o dano mitocondrial provocado pelas Ag-NPs é responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), desencadeando *stress* oxidativo (34,38,41,42). Um aspeto chave em que os vários grupos de investigação parecem estar de acordo é o papel central que o *stress* oxidativo desempenha no mecanismo de toxicidade das Ag-NPs (2,34,38,41,42). Como aliás se encontra amplamente estudado e documentado, a interação de ROS com proteínas, lípidos e DNA, para além de induzir alterações estruturais nestas biomoléculas,

altera também a sua função e conduz à ativação de vias apoptóticas, inflamatórias, entre outras (43).

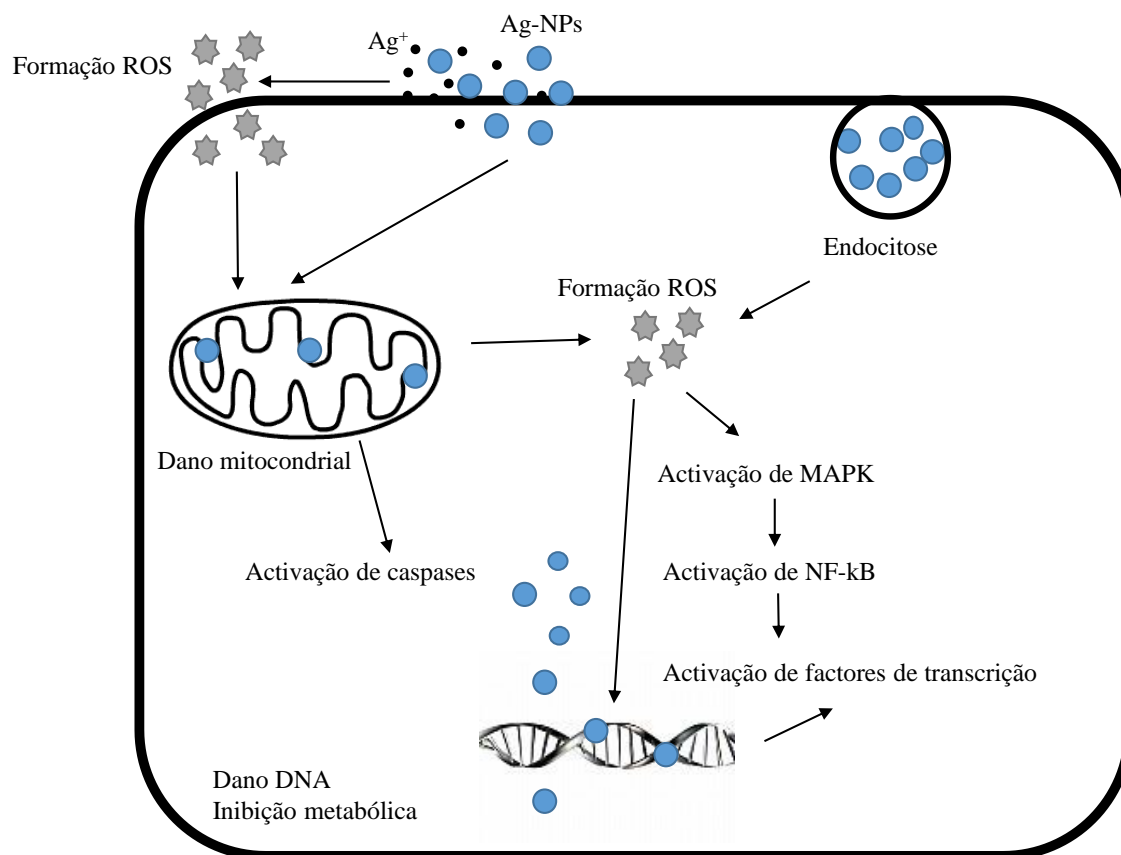


Figura I.6. Mecanismo de toxicidade de Ag-NPs para células eucarióticas humanas. As Ag-NPs durante o seu processo natural de libertação de Ag⁺, também produzem ROS. Após a entrada das NPs por difusão ou endocitose, estas são responsáveis pelo aumento das condições oxidativas (ROS) a que a célula se encontra sujeita. O estímulo oxidativo causa inibição metabólica e dano mitocondrial, potenciando ainda mais o efeito oxidativo dos ROS. Da interação de ROS com o DNA ocorre dano genético e ativação de fatores de transcrição que induzem a ativação de vias sinalizadoras (caspases, MAPK, JNK, p38). Adaptado de (40)

I.2. *Stress* oxidativo e modificações lipídicas

O *stress* oxidativo reflete um desequilíbrio a favor de espécies pró-oxidantes em detrimento de espécies antioxidantes. São várias as situações fisiológicas capazes de provocar *stress* oxidativo como: 1) o aumento de espécies pró-oxidantes, ROS e espécies

reativas de azoto (RNS); 2) a diminuição da atividade de enzimas com atividade antioxidante, e 3) a diminuição da ingestão de moléculas antioxidantes (43).

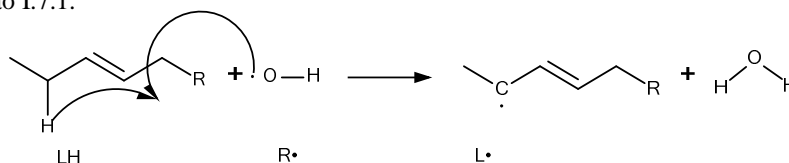
O processo oxidativo pode resultar na ativação de três vias celulares dependendo da duração e intensidade do estímulo oxidativo (43). A primeira via a ser ativada, é a via antioxidante em que as células aumentam a expressão de enzimas antioxidantes, tais como glutathione peroxidase, catalase e a superóxido dismutase, que atuam ao nível dos ROS. Quando o estímulo oxidativo persiste é ativada a via inflamatória com a produção de citocinas e quimiocinas com vista a desencadear mecanismos que permitam minimizar os danos celulares. Quando nenhuma das duas vias anteriormente referidas é capaz de inibir os danos causados pelo estímulo oxidativo e este persiste, a célula vê-se obrigada a ativar a via de citotoxicidade levando à apoptose (43).

As espécies reativas de oxigénio, ROS, entre as quais se encontram o radical hidroxilo (HO^\bullet), o anião superóxido (O_2^-), e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) podem levar à oxidação de biomoléculas, nomeadamente DNA, proteínas e lípidos, a partir da qual se desencadeiam alterações fisiológicas significativas (43–45). Nos parágrafos seguintes dar-se-á especial atenção à oxidação de lípidos, visto ser esta a classe de biomoléculas que é focada no âmbito da presente tese. De entre as espécies ROS, o radical hidroxilo (que pode ser gerado a partir de O_2^- e de H_2O_2), apresenta elevada reatividade perante lípidos polinsaturados, o que na presença de O_2 , culmina na formação de hidroperóxidos lipídicos (44–47). A peroxidação lipídica pode ser catalisada enzimaticamente ou ocorrer pela via não enzimática (por reação com ROS), envolvendo neste caso três etapas; iniciação, propagação e terminação (44–48), conforme se explicará de seguida em mais detalhe.

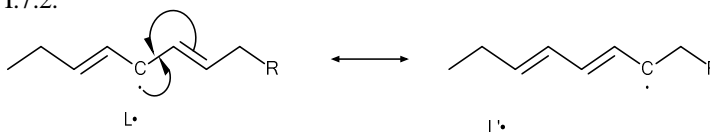
A iniciação do processo de oxidação requer a presença de um radical livre e de um lípido polinsaturado, sendo que lípidos saturados não sofrem oxidação. O processo de oxidação de lípidos é tanto mais extenso e complexo quanto maior for o número de insaturações (44,45). Neste sentido a oxidação lipídica conduz a uma alteração na razão entre lípidos saturados e polinsaturados. A iniciação da oxidação lipídica ocorre entre um lípido insaturado (LH) e um radical livre (R^\bullet), com a formação de um radical lipídico (L^\bullet) (Equação I.7.1-Figura I.7.). No caso do lípido inicial ser polinsaturado, o rearranjo das duplas ligações do L^\bullet pode ocorrer (Equação I.7.2-Figura I.7.). Este rearranjo contribui para a complexidade de produtos que podem ser obtidos a partir do mesmo lípido polinsaturado (44,45). Após a formação do L^\bullet , rapidamente é introduzida na sua cadeia uma molécula de O_2 , originando

um radical peroxilo lipídico (LOO^\bullet) (Equação I.7.3-Figura I.7.). A formação de LOO^\bullet é responsável pela reação de propagação na peroxidação lipídica. A propagação de radicais ocorre enquanto LOO^\bullet reage com moléculas não radicalares, como novas moléculas de lípidos polinsaturados, LH (Equação I.7.4-Figura I.7.). Desta reação formam-se novamente radicais L^\bullet . Nesta etapa o ciclo de formação de L^\bullet , LOO^\bullet repete-se e a peroxidação lipídica propaga-se (fase de propagação). Da reação entre LH e LOO^\bullet culmina a formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (Equação I.7.4-Figura I.7.). Estas moléculas são moléculas relativamente estáveis e são considerados os produtos primários da peroxidação lipídica. No entanto a peroxidação lipídica só termina com a extinção de radicais livres,

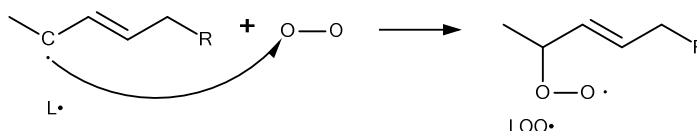
Equação I.7.1.



Equação I.7.2.



Equação I.7.3.



Equação I.7.4.

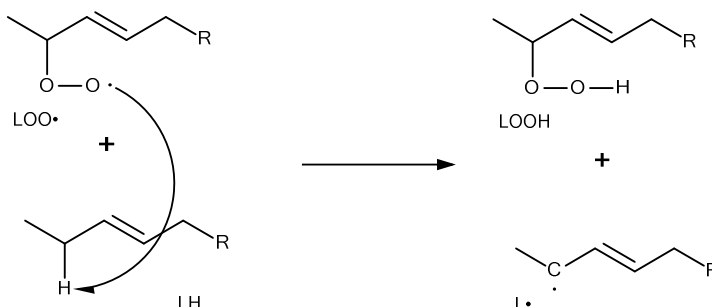
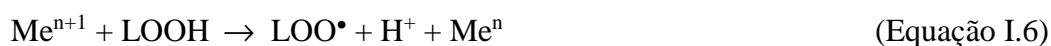


Figura I.7. Mecanismo de peroxidação lipídica: iniciação (Equações I.7.1. e I.7.2); propagação (Equações I.7.3 e I.7.4) e terminação (Equação I.7.4). LH – lípido polinsaturado; L^\bullet - radical lipídico; LOO^\bullet - radical peroxilo lipídico; LOOH – hidroperóxido lipídico.

decorrente da reação entre dois radicais livres (Equações I.2 a I.4), com consequente produção de moléculas mais estáveis e de natureza não radicalar (22-24).



Na peroxidação lipídica não se obtém apenas uma espécie molecular de LOOH. No caso de lípidos polinsaturados podem ocorrer rearranjos dos radicais intermédios formados, fazendo com que a mistura de produtos resultantes da peroxidação lipídica seja complexa (grande variedade de espécies moleculares) (44,45). Outro fator que contribui para a complexidade dos produtos de oxidação lipídica é a degradação dos LOOH formados, produtos primários, em produtos secundários de menor peso molecular (44–46). Os LOOH formados são moléculas relativamente estáveis, no entanto, a sua exposição a temperaturas elevadas ou a presença de metais de transição (Cu^{+} e Fe^{2+}) propiciam sua decomposição. Genericamente, da reação de LOOH com metais de transição (Me^n) formam-se novamente radicais lipídicos alcoxi e peróxido, LO^{\bullet} e LOO^{\bullet} (Equações I.5 e I.6) (44).



Os radicais LO^{\bullet} e LOO^{\bullet} podem sofrer diversos tipos de reações, dando origem a moléculas que são chamadas de produtos secundários da peroxidação lipídica (44–46) (Figura I.8.). As principais classes moleculares obtidas após o processo de decomposição dos hidroperóxidos lipídicos são as isoprostanos, aldeídos e hidrocarbonetos voláteis, entre outras. Muitos destes produtos secundários tem terminais aldeídos extremamente reativos sendo responsáveis por reações cruzadas com proteínas, alterando a sua função e em última consequência vias metabólicas e de sinalização (49,50).

Em suma, as modificações lipídicas induzidas por *stress* oxidativo, em particular ROS, incluem alterações significativas na estrutura de lípidos, que podem resultar na alteração e perda das suas funções biológicas (44–46,49,50). Os lípidos são uma classe de biomoléculas às quais se associa o armazenamento de energia (sob a forma de

triacilglicerídeos), composição e manutenção da estrutura das membranas celulares e ainda sinalização celular (51). Existem dois principais efeitos decorrentes da peroxidação lipídica que se podem considerar, o primeiro ao nível das membranas e um segundo ao nível da geração de produtos secundários. O primeiro efeito causa alteração na função da membrana, aumento na sua fluidez, inativação enzimática e efeito tóxicos na divisão celular (44–46). No caso do segundo efeito, os produtos secundários produzidos, em especial aldeídos, são capazes de se ligarem a proteínas e DNA, comprometendo a função destas biomoléculas (44–46). Todos estes processos podem estar envolvidos nas consequências tóxicas das NPs a nível celular.

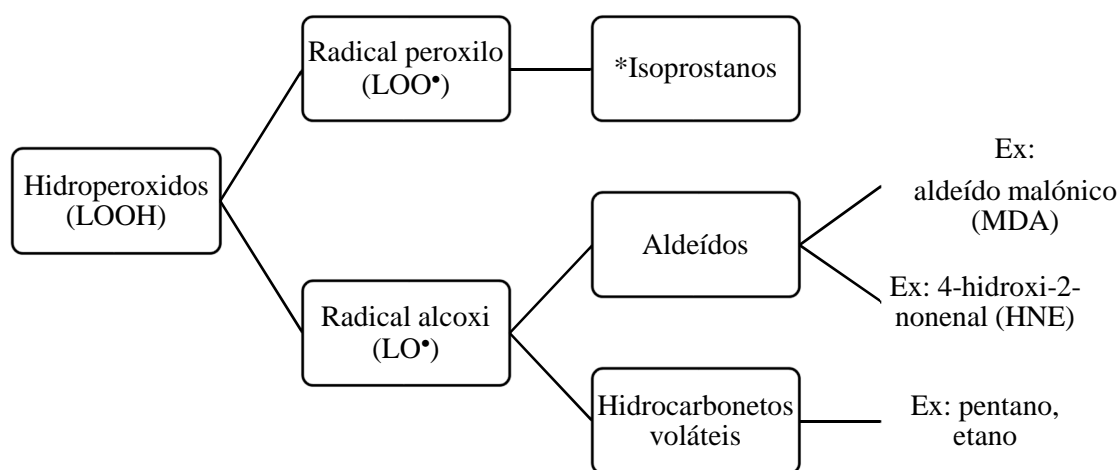


Figura I.8. Produtos secundários de peroxidação lipídica, via formação dos radicais peróxilo e alcoxi, LOO• e LO•. *Produto obtido apenas quando a oxidação lipídica é mediada via enzimática

I.3. Métodos para a avaliação das modificações lipídicas induzidas por *stress* oxidativo

A extensão da peroxidação lipídica em função do *stress* oxidativo pode ser avaliada por vários métodos, não havendo uma metodologia universalmente aceite, mas devendo antes ter-se em conta os objetivos do trabalho e o tipo de amostra, e procurar reunir vários parâmetros que possam dar coerência e credibilidade aos resultados.

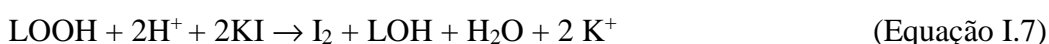
De seguida, serão abordados alguns dos métodos mais comuns que permitem identificar e quantificar os produtos resultantes da oxidação, assim como as alterações relativas nas classes de lípidos, i.e. o perfil lipídico do sistema biológico em estudo. Vários outros métodos, que incluem a monitorização da quantidade de oxigénio e perda do substrato inicial, formação de radicais livres e emissão de produtos luminescentes durante a oxidação (48,52–54), não serão referidos de forma detalhada por serem metodologias pouco usadas e morosas.

I.3.1. Produtos de oxidação lipídica

Os produtos de oxidação lipídica podem ser classificados como primários ou secundários (decorrentes da decomposição dos produtos primários), como referido anteriormente. A avaliação dos diferentes produtos permite acompanhar a extensão da oxidação lipídica em diferentes pontos do processo oxidativo e determinar a que taxas ocorrem (43,47,48,52–54).

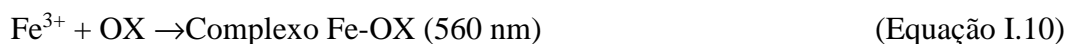
Para a quantificação de LOOH, o valor de peróxidos (PV) pode ser medido por três metodologias distintas: 1) titulação iodométrica; 2) espectroscopia de UV-Vis (560 nm); 3) espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) (44).

A titulação iodométrica é baseada na oxidação do ião iodo (I^-) pelos LOOH, sendo que o iodo libertado (I_2) é titulado com uma solução de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$) usando amido como indicador (Equações I.7 e I.8). Este método é moroso e necessita de quantidade elevada de amostra para a análise, para além de ser um método destrutivo. Este método não é frequentemente usado em amostras biológicas (sangue, plasma), visto que as quantidades de LOOH que se pretendem quantificar são reduzidas (44,52).



A espectroscopia de UV-Vis é um método de fácil execução e amplamente usado para as mais diversas finalidades. A deteção por UV-Vis de complexos de ferro iónico formados na presença de LOOH pode ser usada para a determinação do PV. Os LOOH ao reagirem na presença Fe^{2+} , oxidam o ião a Fe^{3+} , sendo este facilmente complexado com o reagente laranja de xilenol (OX), apresentando um máximo de absorção a 560 nm (Equações

I.9 e I.10). Esta metodologia é a mais usada para a determinação do PV, apresentando uma sensibilidade na ordem das nanomoles de hidroperóxidos (3-5 nmol) (52).



A técnica de FTIR baseia-se nas energias de ressonância dos grupos funcionais químicos (cetona, álcoois, ácidos, esteres entre outros). Desta forma, a identificação das bandas características de O-H podem ser indicativas da presença de LOOH mas também de álcoois e ácidos. Neste sentido, o método é não específico para a quantificação do PV, sendo necessário um passo adicional para aumentar a sua especificidade (53). Os LOOH na presença de trifetilfosfina (TEP) reagem de forma estereoespecífica originando óxido de trifetilfosfina (TEPO) (Equação I.11). Este composto apresenta uma banda característica e intensa a 542 cm^{-1} que é detetada e o PV calculado. Com o uso de TEP, a técnica de FTIR, para além de rápida e sensível, torna-se específica para a identificação de LOOH (53).



Para além dos métodos acima referidos, que dão informação sobre os LOOHs totais, podem ser aplicadas técnicas de cromatografia em fase gasosa e em fase líquida com alto desempenho (GC e HPLC, respetivamente) para quantificar formas específicas de LOOHs (53). Para além de requererem quantidades de amostra reduzidas, o HPLC é capaz ser realizado à temperatura ambiente, permitindo a análise de compostos não voláteis sem a necessidade de derivatização dos LOOHs como é necessário no caso do GC (53).

Um outro método de avaliação da peroxidação lipídica consiste na medição de dienos e trienos conjugados que são produtos decorrentes de rearranjos moleculares que ocorrem nos primeiros estágios da oxidação. Estes compostos apresentam bandas características de absorção na zona do ultravioleta, a 234 nm e 268 nm, respetivamente (44,52,54). Este método tem a vantagem de ser não destrutivo, visto implicar apenas a dissolução do extrato lipídico a quantificar numa solução de ciclo-hexano, que é facilmente evaporado e, após leitura espectrofotométrica, podem ser realizadas outras de análises com a mesma amostra. A sensibilidade do método é elevada, rondando a ordem dos nanomoles (52).

Durante o processo oxidativo, com o aumento do tempo, ocorre decomposição dos LOOHs em produtos secundários, como aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos voláteis e epóxidos entre outros (44–46). Assim o PV diminui com o aumento do tempo de oxidação devido ao aumento da concentração de produtos secundários. A complexidade da mistura de produtos obtidos é tal, que a escolha de um método que permita a sua quantificação não é fácil. Frequentemente são avaliados os produtos formados em maior quantidade, como aldeídos e hidrocarbonetos voláteis (gases), e também específicos, aldeído malónico (MDA) e 4-hidroxo-2-nonenal (HNE) (43,47,48,52–54).

O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) permite a quantificação de espécies reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Entre estas espécies destacam-se aldeídos, e em particular o MDA. Neste teste o TBA reage com MDA/ TBARS, formando um complexo rosa com um máximo de absorção próximo de 530 nm (Equação I.12). A quantificação de aldeídos totais resultantes da decomposição de LOOHs pode ser obtida por um outro método espectrofotométrico que quantifica o valor de *p*-anisidina, (*p*-AnV) (53). Este método é baseado numa reação colorimétrica entre a *p*-metoxianilina (*p*-anisidina) e os aldeídos em condições acídicas. Desta reação resultam produtos que absorvem perto de 350 nm do espectro eletromagnético. Este teste apresenta maior sensibilidade para aldeídos insaturados, visto serem os que apresentam maior contribuição neste comprimento de onda (52,53).



O HNE é um aldeído insaturado importante na oxidação devido ao seu impacto a nível celular, em particular, a sua quantificação em amostras biológicas apresenta elevada relevância no estudo de doenças associadas a *stress* oxidativo (54). A sua monitorização é realizada por técnicas de cromatografia, GC e HPLC, acoplada a espectrometria de massa (MS), conseguindo-se assim elevada sensibilidade (53). No entanto, é necessário ter em conta que durante o processamento e armazenamento da amostra pode ocorrer degradação acrescida de LOOHs, levando a um aumento de HNE que não corresponde ao estímulo em estudo, sendo essencial assegurar condições de temperatura ideais durante todo o processamento da amostra.

Finalmente, existem ainda outro tipo de produtos secundários voláteis que são frequentemente avaliados, gases, em particular o etano e o pentano por GC-MS. Na Tabela I.1. encontram-se descritos os métodos que foram sendo discutidos ao longo desta secção.

Tabela I.1. Metodologias frequentes usadas para a quantificação dos produtos obtidos por peroxidação lipídica

Produto quantificado	Método usado
Hidroperóxidos totais	Espectroscopia UV-Visível (560 nm); Titulação iodométrica; FTIR
Hidroperóxidos específicos	GC; HPLC
Dienos conjugados	Espectroscopia UV-Visível (234 nm)
Trienos conjugados	Espectroscopia UV-Visível (264 nm)
Aldeído malónico	Espectroscopia UV-Visível (530 nm)
Aldeídos	Espectroscopia UV-Visível (530 e 350 nm)
4-hidroxo-2-nonenal	HPLC, HPLC-MS, GC-MS
Hidrocarbonetos voláteis	GC-MS

FTIR - Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier; GC – Cromatografia em fase gasosa; GC-MS – cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa; HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho; HPLC-MS – Cromatografia líquida de alto desempenho acoplada a espectrometria de massa

I.3.2. Perfil lipídico

Quando falamos em caracterizar o perfil lipídico de um sistema biológico, pretendemos identificar quais são os lípidos, de forma individual ou por classes, que variam em função de determinada condição em teste. Esta abordagem permite que, num sistema biológico complexo (como é o caso de células) apenas se olhe para lípidos que sofrem alterações significativas na sua concentração, em resultado do estímulo em estudo. Desta forma o perfil lipídico caracteriza a célula a nível lipídico sob determinada condição. A caracterização deste perfil requer então ferramentas que sejam suficientemente sensíveis a

pequenas alterações e que sejam capazes de analisar a grande variedade de lípidos presente em sistemas biológicos.

Com este tipo de abordagem, duas terminologias, lipidoma e lipidómica, tornaram-se presentes no quotidiano bioquímico. Lipidoma refere-se ao conjunto de todas as espécies lipídicas, enquanto lipidómica se refere ao seu estudo e caracterização (55). Os métodos mais usados na lipidómica englobam processos cromatográficos (TLC, GC e HPLC); espectrometria de massa (ESI, MALDI) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão (^1H) e de fósforo (^{31}P) (53). Na realidade, existem diferentes possibilidades de acoplamento entre as técnicas, o que permite maior sensibilidade e reprodutibilidade nos resultados obtidos. Em termos de técnicas de espectrometria de massa, a técnica de electrospray (ESI-MS) é a mais usada na análise de lípidos pois é uma técnica que permite a ionização dos lípidos de forma suave, ou seja, que não fragmenta as moléculas (56).

I.4. Alterações lipídicas induzidas por nanopartículas de prata

Neste subcapítulo, apresenta-se uma breve revisão do estado da arte relativo à investigação das alterações induzidas por Ag-NPs em lípidos, sejam estes constituintes de sistemas membranares biomiméticos ou de células.

Consistindo em pequenas vesículas formadas por fosfolípidos que se auto-organizam em meio aquoso, os lipossomas têm sido usados como modelos membranares biomiméticos para estudar alterações nas membranas celulares (57). Na Tabela I.2., listam-se os estudos envolvendo lipossomas e Ag-NPs, referindo-se as principais alterações observadas.

Umh *et al.* incubaram vesículas lipídicas com Ag-NPs revestidas a citrato e polivinilpirrolidona (PVP) e verificaram que as alterações morfológicas (ruptura e fusão das vesículas), observadas por microscopia de fluorescência, dependiam da carga superficial das partículas (36). Em particular, os autores observaram que cargas do mesmo sinal à superfície da membrana e da Ag-NP resultaram em repulsão electrostática, permitindo que os lipossomas testados permanecessem intactos. Num outro estudo, a exposição de lipossomas a Ag-NPs revestidas por proteínas (albumina humana) resultou no aumento da fluidez membrana do lipossoma, quando comparado com o efeito provocado pela exposição a Ag-NPs sem qualquer revestimento (58). Estes resultados sugeriram que ocorreu reorganização entre os lípidos constituintes dos lipossomas, com alteração na composição a nível

localizado. O aumento da fluidez membranar de vesículas lipídicas foi ainda verificado num outro estudo em que as Ag-NPs foram encapsuladas no sistema biomimético (37).

Tabela I.2. Estudos realizados em sistemas biomiméticos lipídicos, lipossomas, para o estudo de interações entre membranas lipídicas e nanopartículas de prata

Composição do lipossoma	Nanopartículas testadas (tamanho)	Alterações no lipossoma	Referência
DPPC	Ag-NPs*	↑ Fluidez membrana	(37)
DMPG	Ag-NPs em pó- (64.4 nm)	Rutura da vesicular lipídica, apenas em lipossomas expostos a Ag-NPs em pó e sem qualquer tipo de revestimento	(36)
	PVP-Ag-NPs (35 nm)		
	Citrato-Ag-NPs (33.9 nm)		
	Ag-NPs (5.3 nm)		
DMPC/DMPG	HSA-Ag-NPs (80 nm)	↑ Fluidez membrana	(58)

*- Ag-NPs encapsuladas em lipossomas. DPPC – dipalmitoil fosfatidilcolina; DMPG - dimiristoil fosfatidilglicerol; PVP- polivinilpirrolidona; DMPC – dimiristoil fosfatidilcolina; HSA – albumina de soro humana

No que diz respeito a estudos em modelos celulares ou animais, encontram-se na literatura poucos trabalhos focados nas alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs, sendo que a maior parte se limitou a avaliar produtos secundários específicos da oxidação lipídica, como o MDA (5,59–61) e o 8-isoprostano (62). De forma genérica, estes trabalhos verificaram um aumento da peroxidação lipídica em células expostas a Ag-NPs, comparativamente a células controlo, o que é consistente com a indução de *stress* oxidativo pelas Ag-NPs, como já referido anteriormente. Recentemente, um grupo de investigação utilizou a técnicas acopladas à MS para caracterizar a composição lipídica de membranas de macrófagos humanos expostos a Ag-NPs revestidas com um péptido (63,64). Ao usarem análise multivariada para os dados obtidos e identificaram diferenças consistentes no perfil lipídico, nomeadamente ao nível de algumas fosfatidilcolinas (C32:0, C32:1 e C32:2) e ácidos fosfatídicos (C38:0 e C38:2), entre células controlo e células expostas a Ag-NPs (63).

Os autores investigaram ainda o efeito de um pré-tratamento das células com N-acetilcisteína, tendo verificado que algumas das alterações lipídicas provocadas pelas Ag-NPs se mantinham mesmo na presença deste antioxidante (63). De forma mais específica, foi verificado um aumento nos níveis da liso-fosfatidiletanolamina (C18:3), liso-fosfatidilcolina (C20:4) e ceramidas, e uma diminuição nos níveis da fosfatidiletanolamina (C36:6) e fosfatidilcolina (C42:4), que foram interpretados como resultado de oxidação lipídica (64).

I.5. Objetivos do trabalho

Esta tese de mestrado enquadrou-se num projeto em curso, intitulado “Análise de perfis metabólicos: uma nova metodologia para avaliação dos efeitos toxicológicos e biológicos de nanomateriais” (ref^a. FCT/PTDC/SAU-TOX/120953/2010), cujo objetivo geral é desenvolver novas metodologias para a avaliação da resposta biológica a Ag-NPs. Em particular, este trabalho procurou contribuir para a compreensão das alterações lipídicas induzidas pelas Ag-NPs, tendo como objetivos específicos:

1) Avaliar a peroxidação lipídica em lipossomas expostos a Ag-NPs de diferentes tamanhos e revestimentos. Na base deste objetivo está a hipótese da peroxidação lipídica ser um dos principais mecanismos da resposta biológica a Ag-NPs (muito provavelmente, em relação com o aumento da produção de ROS), sendo importante desenvolver métodos que permitam avaliar esta resposta de forma rápida e fiável. Para este efeito, para além de se usar um método convencional de quantificação de produtos de oxidação, FOX II, explorou-se a possibilidade de utilizar a técnica de espectrometria de massa, para estimar a extensão de oxidação de lípidos insaturados em lipossomas. Em geral, esta abordagem deverá contribuir para compreender se a oxidação lipídica frequentemente observada em modelos celulares resultará de efeitos diretos ou indiretos da ação das Ag-NPs sobre os fosfolípidos membranares.

2) Caracterizar as alterações nos níveis relativos de diferentes classes de fosfolípidos em queratinócitos da pele humana expostos a Ag-NPs. Sendo as células da pele uma das principais barreiras de exposição de Ag-NPs no organismo, pretende-se avaliar de que forma

é o que o perfil fosfolipídico destas células pode ser alterado em função da presença de Ag-NPs. Em particular, serão avaliados produtos de peroxidação lipídica, hidroperóxidos lipídicos e dienos conjugados, juntamente com as variações relativas nas classes de fosfolípidos, utilizando a cromatografia em camada fina.

Capítulo II - Materiais e métodos

II.1. Reagentes

Os padrões de fosfatidilcolinas (DMPC e PLPC) usados na formação dos lipossomas e os padrões das diferentes classes de fosfolípidos, esfingomielinas (SM (16:0/d18:1), fosfatidilcolinas (PAPC), fosfatidilinositóis (dPPI), fosfatidilserinas (mistura), fosfatidiletanolaminas (POPE) e cardiolipinas (mistura) usados em TLC, foram adquiridos à Avanti Polar Lipids, Inc.

O hidrogenocarbonato de amónia (Riedel-de Haën), o sulfato de ferro amoniacal hexa-hidratado (Merck), o cloreto de ferro (Merck), as placas de sílica de TLC com zona de concentração de 20 x 25 cm (Merck), o hidroxitolueno butilado (Sigma-Aldrich), o ácido 2,3-dihidroxibenzoico (Sigma-Aldrich), a primulina (Sigma-Aldrich), o peróxido de hidrogénio 30% (Sigma-Aldrich), o laranja de xilenol (Fluka), ácido sulfúrico 96% (Farmitalia Carlo Erba), o ácido perclórico 70% (ChemLabs), o ácido ascórbico (Fagron), o molibdato de amónia (Panreac), o ácido bórico (BDH Chemicals), a trietilamina (Acros Organics), o clorofórmio *HPLC grade* (VWR Chemicals), a acetona *HPLC grade* (Sigma-Aldrich) foram usados como recebidos. A água miliQ foi obtida por um sistema Millipore Synergy.

As Ag-NPs, de forma esférica, usadas nos estudos foram adquiridas à nanoComposix Europe (Praga, República Checa), apresentando as propriedades descritas na Tabela II.1., de acordo com as especificações do fornecedor. As designações de Cit30, PEG30 e PEG10 foram adotadas para fazer referência a Ag-NPs de 30 nm revestidas a citrato, Ag-NPs de 30 nm revestidas com polietileno glicol (5kDa) e Ag-NPs de 10 nm revestidas com polietileno glicol (5kDa), respetivamente.

Tabela II.1. Propriedades das Ag-NPs usadas neste trabalho

Ag-NPs	Diâmetro (nm)	Revestimento	Potencial zeta (mV) (pH)
Cit30	31.7 ± 3.2	Citrato de sódio	-45.2 (7.6)
PEG30	32.9	Polietileno glicol (5kDa)	-10 ± 10 (6.5)
PEG10	9.8 ± 2.0	Polietileno glicol (5kDa)	-10 ± 10 (6.1)

II.2. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em sistema lipossómico

II.2.1. Formação dos lipossomas de fosfatidilcolinas

Para a formação dos lipossomas de fosfatidilcolinas (PCs), foram adicionados num vial 200 μL (correspondente a 200 μg) de PLPC ressuspensa em clorofórmio (1 mg/mL), e secos sob corrente de azoto. Seguiu-se a adição de 50 μL (correspondente a 50 μg) de DMPC ressuspensa em clorofórmio (1 mg/mL) e a secagem sob corrente de azoto, de modo a formar um filme de PCs nas paredes do vial. Adicionou-se depois um volume variável de solução tampão de hidrogenocarbonato de amónia (5 mM, pH 7.4), de acordo com as condições testadas (como explicado mais à frente), de modo a que a DMPC e a PLPC apresentassem concentrações finais de 0.5 mg/mL e de 2 mg/mL, respetivamente, num volume final de incubação de 100 μL . A solução usada como controlo foi obtida pela adição de 100 μL de tampão ao filme de DMPC e PLPC preparado da forma descrita anteriormente. De seguida, a solução contida em cada vial foi agitada em vortex durante 10 minutos, levada ao banho de ultrassons durante 15 minutos e novamente agitada em vortex durante 5 minutos. Os lipossomas multilamelares preparados não foram caracterizados.

II.2.2. Oxidação de fosfolípidos presentes no lipossoma induzida pelo radical hidroxilo formado pela reação de Fenton

Como controlo para a oxidação das PCs foi usada a reação de Fenton (50 mM de peróxido de hidrogénio e 40 μM de cloreto de ferro). Para isso foram preparadas duas soluções *stock*, uma de peróxido de hidrogénio (500 mM) e outra de cloreto de ferro (1 mg/mL). De seguida, a um vial com 89.2 μL de solução tampão de hidrogenocarbonato de amónia (5 mM, pH 7.4), foram adicionados 0.8 μL da solução de cloreto de ferro e 10 μL da solução de peróxido de hidrogénio, perfazendo o volume total de incubação de 100 μL . O vial foi vortexado por breves segundos e o seu conteúdo transferido para um eppendorf, onde a incubação da solução ocorreu a 37°C e a 700 rpm. A avaliação da peroxidação lipídica, foi feita em alíquotas de 40 μL recolhidas após 24 e 72 horas de incubação e extraídas como descrito na secção II.2.4. Os ensaios foram realizados em duplicado.

II.2.3. Incubação de lipossomas com Ag-NPs na ausência e presença de H₂O₂

Para a incubação dos lipossomas de PCs com as Ag-NPs: Cit30, PEG30 e PEG10 foram escolhidas as concentrações de 10 µg/mL e 40 µg/mL para avaliar a peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs. Para os ensaios realizados, na ausência ou na presença de H₂O₂, foram adicionadas aos respetivos vials os volumes de tampão de hidrogenocarbonato de amónia (5 mM, pH 7.4), solução de peróxido de hidrogénio (500 mM) e solução de cada Ag-NP (1mg/mL) descritos na Tabela II.2. Após a adição de todos os reagentes, agitou-se em vortex durante alguns segundos, o conteúdo de cada vial foi transferido para um eppendorf e a incubação das soluções ocorreu a 37°C e a 700 rpm. Para avaliação da peroxidação lipídica alíquotas de 40 µL foram recolhidas após 24 e 72 horas de incubação para posterior extração das PCs como descrito na secção II.2.4. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Tabela II.2. Volumes de tampão de hidrogenocarbonato de amónia (5 mM, pH 7.4), solução de peróxido de hidrogénio (500 mM) e solução de Ag-NPs (1mg/mL) adicionado em cada ensaio.

Ensaio	Tampão (µL)	H ₂ O ₂ (µL)	Ag-NPs (µL)
10 µg/mL Ag-NP	99	0	1
40 µg/mL Ag-NP	96	0	4
10 µg/mL Ag-NP (+)	89	10	1
40 µg/mL Ag-NP (+)	86	10	4

(+) indica a incubação na presença de peróxido de hidrogénio

II.2.4. Extração lipídica de lipossomas

Para a extração das PCs dos lipossomas de cada alíquota recolhida (40 µL correspondentes a aproximadamente 80 µg de PLPC e a 20 µg de DMPC) num eppendorf lavado previamente em metanol foram adicionados 53.3 µL de metanol e 106.6 µL de clorofórmio. Agitou-se em vortex durante breves segundos, antes de efetuar uma centrifugação a 4000 rpm durante 5 minutos. Cada fase orgânica (fase inferior) foi recolhida para vials identificados, e seca sob corrente de azoto. O extrato lipídico foi armazenado a -20°C até à sua análise.

II.2.5. Avaliação da peroxidação lipídica

Método FOX II: A quantificação de hidroperóxidos lipídicos (LOOHs) foi realizada pelo método de FOX II (65). Todo o material de vidro usado nesta quantificação foi passado previamente por ácido nítrico (5 %) durante pelo menos 24 horas, para evitar que a quantificação fosse afetada pela presença de LOOHs existentes no material. Brevemente, o reagente FOX (100 mL) foi preparado pela adição sequencial e consequente agitação de 9.8 mg de sulfato de ferro amoniacal hexa-hidratado (250 μ M), 5 mL de água miliQ, 139 μ L de ácido sulfúrico (25 mM), 88.2 mg de hidroxitolueno butilado (4 mM), 7.2 mg de xilenol de laranja (100 μ M), 45 mL de metanol, 5 mL de água miliQ e novamente 45 mL de metanol num copo previamente tapado com papel de alumínio. Soluções padrão de peróxido de hidrogénio foram preparadas (0; 0.01; 0.02; 0.05; 0.1; 0.2 e 0.4 mM) para calibração do método. A cada 25 μ L de extrato lipídico ressuspendido em clorofórmio (1 mg de PC/mL) ou a 25 μ L da solução padrão foram adicionados 475 μ L do reagente FOX e deixados no escuro durante 30 minutos. A leitura da absorvância das soluções foi realizada a 560 nm num leitor de placas (Multiscan 90, ThermoScientific). Os ensaios foram realizados em duplicado.

MALDI-TOF-MS: As incubações decorrentes do uso de Ag-NPs foram monitorizadas por MALDI-MS utilizando um espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems, Foster City, CA) com detecção de iões positivos e no modo *reflectron* (laser 337 nm). Para tal foi preparada uma solução da matriz ácido 2,3-dihidroxibenzóico (10 mg/mL) em metanol: água miliQ (9:1, v:v). A cada 5 μ L de amostras ressuspendidas em clorofórmio (1.5 mg PL/ mL) foram adicionados 5 μ L da matriz previamente preparada. As soluções acabadas de preparar foram aplicadas em duplicado na placa de MALDI (0,5 μ L) e deixadas a secar. Após a cristalização da matriz a placa foi introduzida no espectrómetro de massa para a aquisição dos espectros. Os espectros foram adquiridos na gama de m/z de 500 a 4000 e os dados analisados usando o Data Explorer® (Applied Biosystems).

II.2.6. Análise estatística

Todos os resultados se encontram expressos como o valor médio \pm erro padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando Graphpad Prism 5.01 (San Diego, USA) com recurso ao teste t de *student (unpaired)*. As diferenças foram consideradas

significativas para $p < 0,05$.

II.3. Alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs em queratinócitos humanos

Os extratos lipídicos totais das células HaCaT expostas a Ag-NPs foram preparados por colegas da equipa a trabalhar no projeto em que se enquadra a presente tese (ref^a PTDC/SAU-TOX/120953/2010). Feste modo, apenas se apresentará uma breve descrição desta preparação.

II.3.1. Exposição de células HaCaT a Ag-NPs

As células HaCaT (linha de queratinócitos da pele humana) foram cultivadas em meio DMEM com 10 % de albumina fetal bovina (37°C, 5% CO₂) e sujeitas à exposição a diferentes tipos de Ag-NPs, Cit30; Peg30 e PEG10 (10 e 40 µg/mL de Ag-NP); e a AgNO₃ (0,6 e 1,2 µg/mL). O período de incubação variou entre 24 horas e 48 horas, ao fim das quais se realizou a extração de lípidos totais. Os ensaios foram realizados em triplicado.

II.3.2. Obtenção do extrato lipídico total das células HaCaT

A extração das fases orgânicas e aquosas das células HaCaT incubadas em cada condição decorreu em simultâneo, com base no método modificado de Bligh & Dyer (66). Após a remoção do meio das placas, foi adicionado PBS para lavagem da placa, e de seguida adicionado metanol frio (650 µL, 80%) para a remoção das células da placa. À suspensão de células foi adicionado clorofórmio (260 µL), seguindo-se de 1 minuto de agitação em vortex. Procedeu-se de seguida à adição de clorofórmio e água deuterada (260 e 220 µL, respetivamente). Após 10 minutos em gelo, as amostras foram centrifugadas a 2000 g durante 15 minutos. Todas as fases foram devidamente recolhidas. As fases orgânicas contendo os lípidos foram secas num Speedvac, e antes do seu armazenamento foram submetidas a uma corrente de azoto para prevenção de oxidação lipídica. As amostras foram guardadas a -20° C até à sua análise.

II.3.3. Estimativa da quantidade de fosfolípidos nos extratos lipídicos totais

Para estimar a quantidade de lípidos extraída foi quantificado o fósforo presente em fosfolípidos recorrendo ao método de quantificação de fósforo (67). Todo o material de vidro usado nesta quantificação foi passado previamente por ácido nítrico (5 %) durante pelo menos 24 horas, para garantir que a quantificação não era afetada pelo fósforo eventualmente existente no material. Inicialmente, cada extrato lipídico total foi ressuspensionado em 300 μL de clorofórmio, e foram adicionados 10 μL de extrato a um tubo devidamente identificado. Os extratos totais foram secos sob corrente de azoto, e ao tubo foram adicionados 650 μL de ácido perclórico 70% e incubados a 180°C durante uma hora. Enquanto isso foi adicionado também a diferentes tubos 1, 0.2; 0.4; 0.7; 1.0; 1.5 e 2 μL de uma solução *stock* de dihidrogenofosfato dihidratado (100 g/mL). A mesma quantidade de ácido perclórico (650 μL) foi adicionado aos tubos dos padrões. Após o arrefecimento dos tubos com os extratos totais, foram adicionados a todos os tubos (extratos totais e padrões) 3.3 mL de água miliQ, 500 μL de molibdato de amónia (2.5 g/100 mL) e 500 μL de ácido ascórbico (10 g/100 mL), seguindo-se de uma incubação em banho de água (100° C, 5 minutos). No caso de as amostras provenientes da raspagem de *spots* de TLC (descrito em II.2.6.), 1 mL da solução foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos após esta incubação. Finalmente a absorvância dos extratos lipídicos (totais ou dos *spots* de TLC) e padrões foi medida a 800 nm num leitor de placas (Multiscan 90, ThermoScientific). Para as amostras provenientes de TLC, a quantidade relativa de cada fosfolípido (PL) foi calculada tendo em conta a quantidade de fósforo de cada *spot* de TLC para a quantidade de PL total aplicada.

II.3.4. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos

A quantificação de hidroperóxidos lipídicos (LOOHs) foi realizada pelo método de FOX II (65). Todo o material de vidro usado nesta quantificação foi passado previamente por ácido nítrico (5 %) durante pelo menos 24 horas, para garantir que a quantificação não era afetada pela presença de LOOHs existentes no material. O reagente FOX foi preparado como descrito anteriormente (secção II.2.5.). Soluções padrão de peróxido de hidrogénio foram preparadas (0; 0.01; 0.02; 0.05; 0.1; 0.2 e 0.4 mM) para calibração do método. A cada 25 μL de extrato lipídico ressuspensionado em clorofórmio (1 mg de PC/mL) ou a 25 μL da solução padrão foram adicionados 475 μL do reagente FOX e deixados no escuro durante 30 minutos. A leitura da absorvância das soluções foi realizada a 560 nm num leitor de placas

(Multiscan 90, ThermoScientific). Os ensaios foram realizados em duplicado.

II.3.5. Quantificação de dienos conjugados

Ressuspendeu-se cada amostra em 500 μL de ciclo-hexano e mediu-se a absorvância a 233 nm contra o respetivo branco (solução de ciclo-hexano). Os valores de dienos conjugados para cada amostra foram calculados partir do coeficiente de extinção, de $2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (68), tendo o valor obtido sido normalizado pela quantidade de PL presente na amostra aquando a análise.

II.3.6. Separação de classes de lípidos por cromatografia em camada fina

A separação das várias classes de fosfolípidos foi realizada por cromatografia em camada fina (TLC). As placas de TLC (com zona de concentração 25 x 20 cm) foram lavadas numa solução de metanol: clorofórmio (1:1, v/v) e secas. Aplicou-se depois ácido bórico (2.3%, m/v) com um sistema de *spray* e secaram-se as placas numa estufa a 100° C durante 15 minutos. Depois de as placas terem atingido a temperatura ambiente, aplicaram-se 20 μL de extrato total ressuspendido em clorofórmio (1.5 mg/mL). Os locais onde foram aplicadas as amostras e os padrões de PLs (esfingomielinas, fosfatidilcolinas, fosfatidilinositóis, fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas e cardiolipinas) foram secos na corrente de azoto e a placa de TLC foi colocada na camara de corrida com uma mistura de clorofórmio: etanol: água: trietilamina (30:35:7:35, v/v/v/v) durante aproximadamente hora e meia. Os *spots* da placa de sílica foram revelados com uma solução de primulina (50 $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$) em acetona: água (80:20, v/v) e visualizadas com uma lâmpada UV ($\lambda=254 \text{ nm}$). A identificação das classes de fosfolípidos foi realizada com o recurso a padrões que foram aplicadas na placa de TLC aquando a corrida das amostras. Posteriormente à identificação de cada *spot*, cada um foi raspado da placa e colocado em tubos previamente passados por ácido nítrico e feita a quantificação de fosfato como anteriormente descrito em II.3.3.

II.3.7. Análise estatística

Todos os resultados se encontram expressos como o valor médio \pm erro padrão da média. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando Graphpad Prism 5.01 (San Diego, USA) com recurso ao teste *t* de *student*. (*unpaired*) As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

Capítulo III - Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em lipossomas

III.1. Otimização dos métodos para a avaliar a peroxidação lipídica em lipossomas

Neste capítulo, serão apresentados os resultados da avaliação da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs num sistema modelo constituído por lipossomas de fosfatidilcolinas (PC). Esta classe de fosfolípidos (PL) encontra-se representada nas membranas celulares, em percentagens relativas que atingem valores entre 40-60% do conteúdo total de PL, dependendo do tipo de membrana (51). Espera-se, pois, que os lipossomas de PCs adotados constituam um bom modelo biomimético das condições membranares.

De entre os métodos disponíveis para a avaliação da peroxidação lipídica (descritos em I.3.), foram selecionados dois para a realização deste trabalho: 1) a quantificação de produtos de oxidação, nomeadamente os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), usando o método de FOX II; 2) a espectrometria de massa (MS) para avaliar a variação relativa das PCs constituintes dos lipossomas, nomeadamente a DMPC (constituída por ácidos gordos saturados, logo não sofre qualquer alteração em condições oxidativas), e a PLPC (espécie contendo o ácido linoleico, suscetível de sofrer oxidação).

No caso do método de FOX II, que utiliza a espectrofotometria de UV-Vis, a presença de Ag-NPs na amostra não interfere com a realização experimental, visto que as Ag-NPs têm um máximo de absorvância (~400 nm) diferente daquele em que as medições ocorrem (560 nm). No entanto, no caso da MS, a possível interferência das Ag-NPs teve de ser averiguada. A análise de PLs e de PLs oxidados por MS recorre principalmente ao método de electrospray (ESI) para a ionização das amostras (56). Com esta técnica, a solução a analisar deve passar por um capilar e por uma agulha, constituintes da fonte de ESI, com um diâmetro inferior a 100 µm. Ora, no caso do presente trabalho, a eventual presença de Ag-NPs nos extratos lipídicos preparados a partir dos lipossomas incubados com as Ag-NPs poderia levar ao entupimento da agulha/capilar de ESI. Por esse motivo, foi necessário fazer um estudo prévio da possibilidade de separação das NPs dos compostos lipídicos de interesse, conforme se descreve em seguida.

Para este ensaio preliminar foi realizada a incubação dos lipossomas na presença de Cit30 e PEG30 (10 µg/mL), durante duas horas, ao fim da qual se realizou a extração da fase orgânica com uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1). Visualmente, as alíquotas resultantes das extrações apresentaram colorações diferentes (resultados não mostrados). A

fase orgânica resultante da incubação dos lipossomas com Cit30 apresentou um aspeto límpido, mas aquando da extração de lípidos verificou-se a formação de uma interfase acinzentada, refletindo possivelmente oxidação das Cit30 pela adição dos solventes usados na extração. O espectro UV-Vis correspondente (Figura III.1.A) indicou efetivamente a ausência de Cit30 na fase orgânica, embora a análise por TEM tenha mostrado a presença de alguns agregados (Figura III.1.B). Em relação à incubação dos lipossomas com PEG30, a respetiva fase orgânica apresentou uma tonalidade amarelada indicando a presença de NPs como se veio a confirmar por espectroscopia UV-Vis (Figura III.1.A). Tentou-se então a ultra-centrifugação da fase orgânica, usando os tempos e velocidades recomendados para a separação deste tipo de NPs (20000 g, 1 hora, 4°C, de acordo com as recomendações da nanoComposix). No entanto, conforme verificado por UV-Vis (Figura III.1.A), não foi possível separar completamente as NPs da fase orgânica.

Face a estes resultados, experimentou-se ainda uma outra abordagem que constituiu na ultra-centrifugação de amostras de lipossomas + Ag-NPs (em tampão), antes de proceder à extração de lípidos. Para este efeito, incubaram-se três eppendorfs diferentes: controlo (lipossomas na ausência de Ag-NPs), Cit30 (lipossomas + 10 µg/mL de Cit30) e PEG30 (lipossomas + 10 µg/mL de PEG30) durante 24 horas (Figura III.2.A). De seguida, estas amostras foram ultracentrifugadas (20000 g, 1 hora, a 4°C) e só depois os sobrenadantes

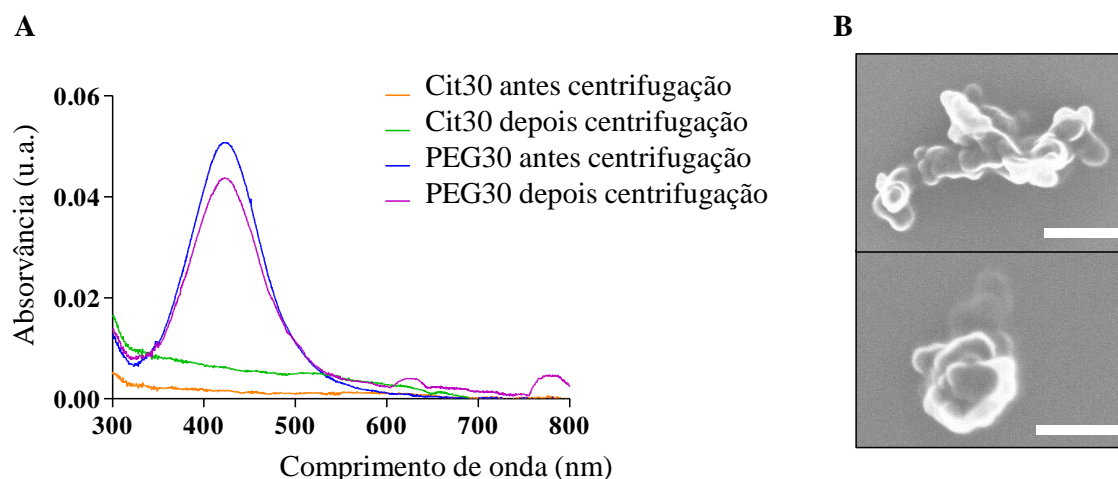


Figura III.1. Comportamento das Ag-NPs, Cit30 e PEG30, em clorofórmio. A – Espectro de UV-Vis da fase orgânica resultante das incubações de lipossomas com Cit30 ou PEG30, antes e após centrifugação das mesmas (20000 g, 1 hora, a 4°C). B – Imagens TEM da fase orgânica resultante da incubação de lipossomas com Cit30, onde são visíveis agregados de Cit30. As barras de escala apresentadas correspondem a 200 nm.

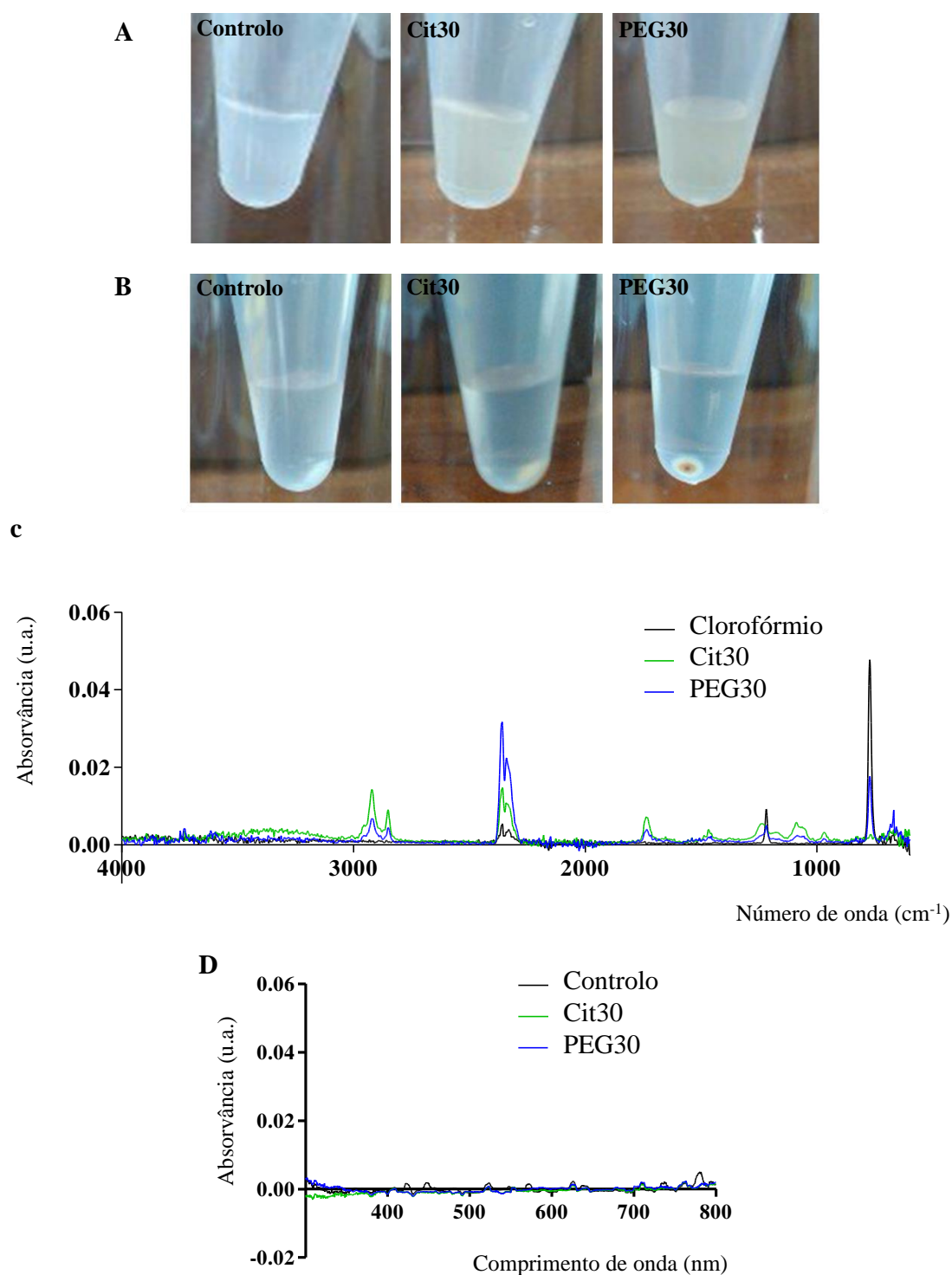


Figura III.2. Aspeto visual das reações controlo (lipossomas na ausência de Ag-NPs), Cit30 (lipossomas + 10 $\mu\text{g/mL}$ de Cit30) e PEG30 (lipossomas + 10 $\mu\text{g/mL}$ de PEG30) antes (A) e após centrifugação - 20000 g, 1 hora a 4°C (B). C - Espectro FTIR dos pellets obtidos após centrifugação em Cit30 e PEG30. D - Espectro de UV-Visível da fase orgânica das reações controlo, Cit30 e PEG30.

foram extraídos. Visualmente, as três soluções obtidas após centrifugação (controle, Cit30 e PEG30), mostraram um pellet depositado no fundo do eppendorf (Figura III.2.B). Na amostra controle, este pellet apresentou uma coloração esbranquiçada, enquanto nas amostras com NPs Cit30 e PEG30 os pellets formados apresentaram zonas de coloração mais escuras. Estes resultados sugeriram que a centrifugação tivesse levado não só à deposição das Ag-NPs como também dos próprios lipossomas, uma vez que se formou um pellet na amostra controle. Para verificar esta hipótese, este pellet foi analisado por espectroscopia de Infravermelho (FTIR), tendo-se efetivamente verificado a presença dos lípidos através dos sinais a 1100, 1700 e 3000 cm^{-1} (Figura III.2.C), correspondentes aos grupos fosfato, carbonilo e metano/metileno, respetiva mente (69). Para além disso, procedeu-se à extração dos sobrenadantes e recorreu-se à espectroscopia de UV-Vis para verificar a presença de NPs. Como esperado, os espectros mostram a ausência de um máximo de absorvância próxima de 400 nm em qualquer uma das condições (Figura III.2.D), confirmando que as NPs estariam depositadas nos pellets. No entanto, uma vez que a centrifugação levou também à deposição dos próprios lipossomas, esta abordagem não se revelou eficaz para separar as NPs dos extratos lípidos para a posterior análise por MS.

Assim, estes ensaios prévios permitiram concluir que: 1) Ag-NPs com revestimento neutro (PEG30) têm maior afinidade para solventes orgânicos (clorofórmio); 2) com base na ultra-centrifugação, não foi possível a separação total das Ag-NPs em fase orgânica lipídica.

Perante estes resultados, não tendo sido possível separar com eficácia as Ag-NPs das PCs, teve de descartar-se a possibilidade de usar ESI-MS para a avaliação da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs. Em alternativa, foi testado o método de ionização e dessorção por laser assistida por matriz (MALDI) como fonte de ionização. Este método recorre à irradiação por laser da amostra aplicada com uma matriz numa placa, pelo que apenas os iões formados vão para o analisador, reduzindo assim significativamente qualquer possibilidade de interações entre os componentes do equipamento e as Ag-NPs.

De seguida, apresentam-se os resultados da aplicação de MALDI-MS à avaliação da peroxidação de lipossomas sujeitos ao reagente de Fenton (peróxido de hidrogénio e iões Fe^{2+}), por forma a validar esta metodologia antes de a aplicar ao estudo dos lipossomas incubados com Ag-NPs.

Como referido anteriormente, os lipossomas utilizados nos nossos ensaios foram preparados utilizando duas PCs: a 1,2-dimeristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC) e a 1-palmitoil-2-linoleoil-3-fosfocolina (PLPC) (Figura III.3.). A DMPC, por ser um lípido saturado, não sofre oxidação durante o período de incubação, ao contrário da PLPC. Desta forma, calculando a razão entre os valores da abundância relativa dos iões moleculares $[DMPC+H]^+$ e $[PLPC+H]^+$ (valores de m/z 678.6 e 758.6, respetivamente) é possível obter indicação acerca da ocorrência e extensão da peroxidação lipídica.

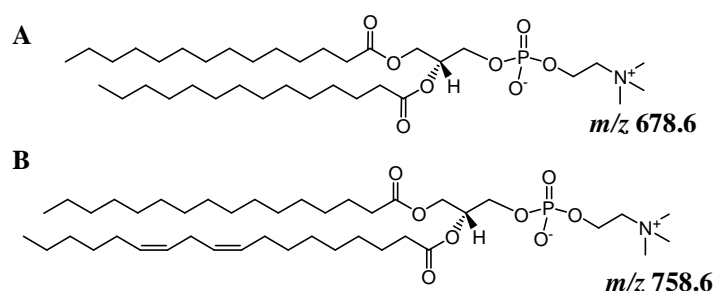


Figura III.3. Estrutura química da: A - 1,2-dimeristoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (DMPC); B - e da 1-palmitoil-2-linoleoil-3-fosfocolina (PLPC).

A Figura III.4. mostra os espectros de MALDI-MS obtidos para uma amostra controlo (lipossomas em tampão) e uma amostra de lipossomas incubados com o reagente de Fenton. Nos espectros de MS do extrato lipídico da amostra controlo é possível identificar os iões de m/z 678.6, 700.6, 758.6, 780.6 e 796.6 correspondentes aos iões de PCs não oxidados, $[DMPC+H]^+$, $[DMPC+Na]^+$, $[PLPC+H]^+$, $[PLPC+Na]^+$ e $[PLPC+K]^+$, respetivamente (Figura III.4.A). Por outro lado, no espectro do extrato lipídico obtido a partir da amostra submetida à oxidação por reação de Fenton (Figura III.4.B) identificam-se os iões dos PLs não oxidados (como na amostra controlo), e observam-se ainda novos iões correspondente aos produtos de oxidação da PLPC, tais como $[PLPC+O+H]^+$, $[PLPC+2O+H]^+$ e $[PLPC+2O+Na]^+$ (iões de m/z 772.6, 790.6 e 812.6, respetivamente) (Figura III.4.B), de acordo com o descrito em estudos prévios (70,71). Para além disso, observa-se um aumento significativo da razão $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$ (ião m/z 678.6 e ião m/z 758.6), que reflete a oxidação da PLPC. Efetivamente, enquanto a abundância da DMPC se mantém ao longo do período de incubação (uma vez que não sofre oxidação), a reação de Fenton leva à oxidação de algumas moléculas de PLPC, pelo que a sua abundância diminui, traduzindo-se numa diminuição da abundância relativa do ião m/z 758.6 comparativamente

ao íão m/z 678.6 nos espectros de MS. Assim calculando a variação da razão $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ (íão m/z 678.6 e íão m/z 758.6), podemos estimar a extensão da oxidação da PLPC. Nos espectros mostrados na Figura III.4, esta razão foi de 0.46 e de 0.75, no controlo e na reação de Fenton, respetivamente. Este aumento de 1.6 vezes relativamente ao controlo é indicativo de que ocorreu oxidação de PLPC.

Os ensaios descritos acima foram realizados pelo menos em triplicado, permitindo confirmar a reprodutibilidade do método. Para além disso, as mesmas amostras (controlo e Fenton) foram analisadas por ESI-MS, que revelou resultados muito semelhantes para a extensão da oxidação induzida pelo reagente de Fenton (resultados não mostrados). Deste modo, confirmou-se que a análise por MALDI-MS pode ser usada para a avaliação da peroxidação lipídica por MS das amostras com Ag-NPs.

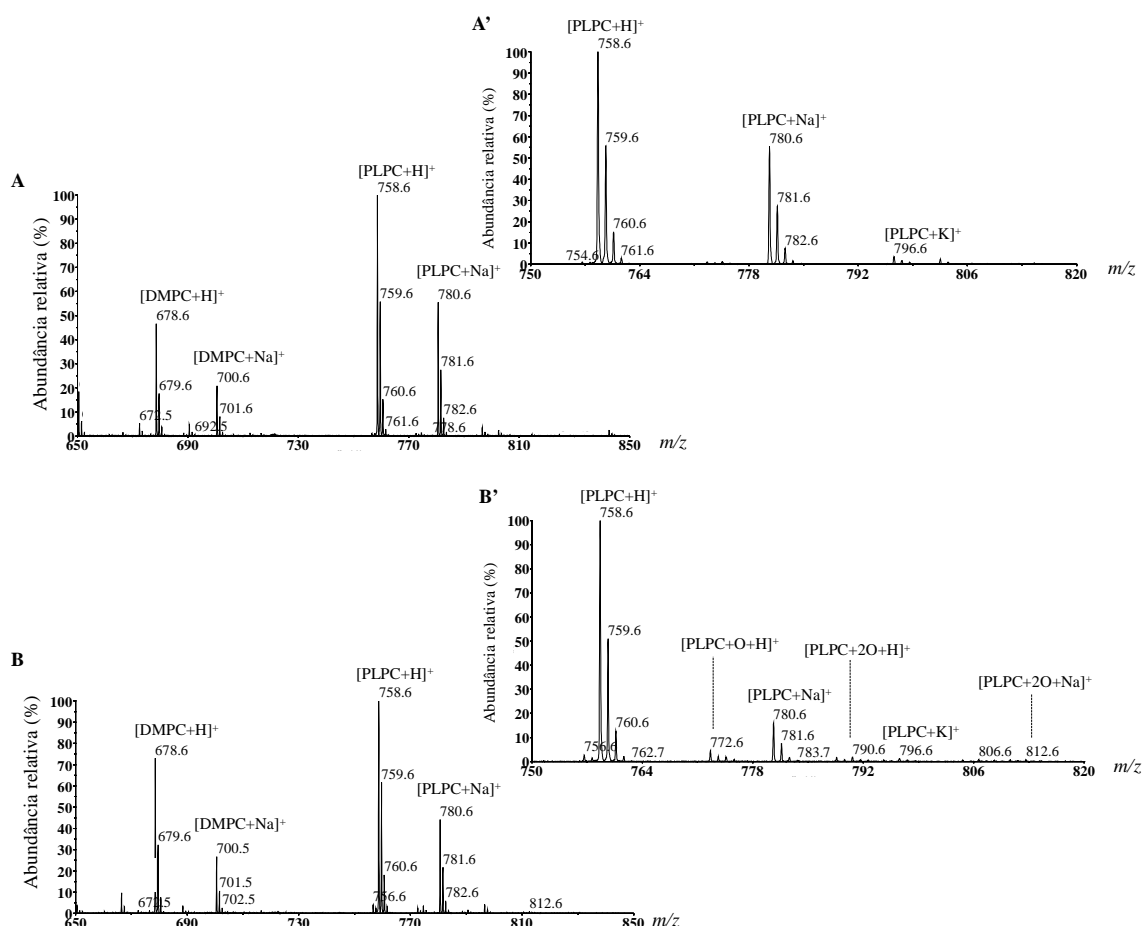


Figura III.4. Espectro de massa obtidos por MALDI-MS do controlo e da reação de Fenton às 24 horas de incubação, A e B, respetivamente. As alíneas (') representam ampliações do respetivo espectro.

III.2. Estudo da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs

A peroxidação dos lipossomas de PCs foi avaliada em função da concentração de Ag-NPs (10 $\mu\text{g/mL}$ vs. 40 $\mu\text{g/mL}$); do revestimento (citrato vs. polietileno glicol-PEG) e do tamanho (10 nm vs. 30 nm). Para esse propósito, a incubação das Ag-NPs com os lipossomas foi realizada na ausência e na presença de H_2O_2 , de modo a permitir por um lado, avaliar a capacidade de oxidação das NPs *per si*, e, por outro, avaliar o seu efeito na presença de uma espécie reativa de oxigênio endógena, o H_2O_2 , cuja concentração se encontra exacerbada em situações de inflamação.

Na presença de H_2O_2 , a incubação dos lipossomas com cada um dos tipos de Ag-NPs (Cit30, PEG30 e PEG10) resultou numa mudança de cor da mistura reacional de amarelado para transparente após a adição de H_2O_2 , em menos de 10 minutos de incubação. Em consonância com o já reportado anteriormente, esta mudança poderá refletir a oxidação das Ag-NPs com libertação de Ag^+ para o meio reacional (72–77). De modo a testar esta hipótese, foi usada a espectrofotometria de UV-Vis (Figura III.5.). O desaparecimento da banda típica de ressonância plasmónica de superfície (~ 400 nm) após 10 minutos de incubação dos lipossomas com as Ag-NPs (Cit30) na presença de H_2O_2 , permitiu efetivamente confirmar a ocorrência de oxidação das Ag-NPs, à qual deverá estar associada a produção do radical hidroxilo, segundo a equação III.1.

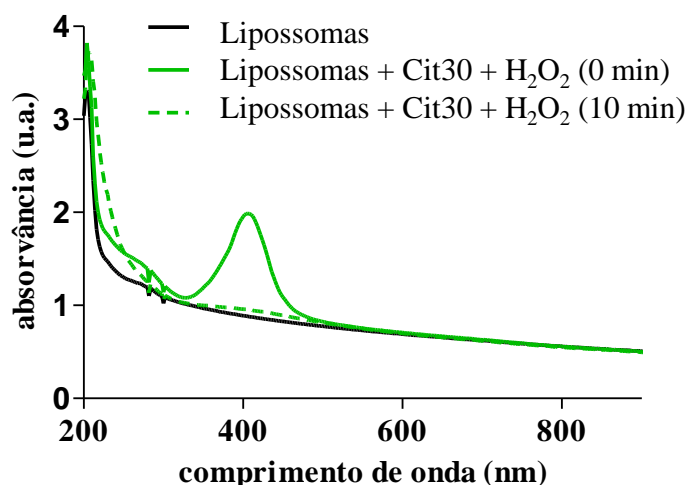


Figura III.5. Espectro de UV-Vis de lipossomas incubados na presença de H_2O_2 (50 mM) e de Cit30 (40 $\mu\text{g/mL}$), imediatamente após a adição do último reagente (Cit30) - 0 minutos e após de 10 minutos de incubação.



Nos próximos subcapítulos, apresentar-se-ão os resultados da avaliação da peroxidação lipídica obtidos pelo método de MALDI-MS e, em paralelo, pela quantificação de LOOHs (método de FOX II), após 24 e 72 horas de incubação dos lipossomas com cada tipo de NPs. No final far-se-á a comparação dos efeitos das NPs com diferentes revestimentos e tamanhos.

III.2.1. Efeito das Ag-NPs Cit30

Os resultados de MALDI-MS para a razão $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ sugerem que as Ag-NPs Cit30 tenham provocado oxidação da PLPC tanto na ausência como na presença de H_2O_2 , já que essa razão aumentou significativamente em todos os casos relativamente ao controlo (Tabela III.1.), tanto às 24 horas (Figura III.6.A) como às 72 horas de incubação (Figura III.6.B). No entanto, na ausência de H_2O_2 , verificou-se que as variações desta razão não foram acompanhadas pelo surgimento no espectro de MS dos iões correspondentes aos produtos da oxidação da PLPC (Figura III.7.A,C). Para além disso, os resultados de FOX II (Figura III.6.C,D) também não corroboraram a ocorrência de oxidação, pelo que as variações observadas na razão $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ poderão ter outra origem que não a oxidação da PLPC, como se discutirá mais adiante.

Na presença de H_2O_2 (50 mM), os valores de $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ aumentaram significativamente de 0.47 ± 0.02 para 0.69 ± 0.02 e 2.65 ± 0.83 nas concentrações de 10 e 40 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente, às 24 horas (Tabela III.1.). A mesma tendência de aumento com a dose de NPs foi também verificada às 72 horas (Figura III.6.B). Adicionalmente, os espectros de MALDI-MS destas amostras apresentaram os sinais correspondentes aos iões m/z 772.6 ($[\text{PLPC}+\text{O}+\text{H}]^+$), 790.6 ($[\text{PLPC}+2\text{O}+\text{H}]^+$) e 812.6 ($[\text{PLPC}+2\text{O}+\text{Na}]^+$) (Figura III.7.B,D), confirmando a ocorrência de peroxidação lipídica induzida pelas Ag-NPs Cit30 na presença de H_2O_2 . Os resultados obtidos por FOX II ajudaram também a corroborar esta observação pois mostraram um aumento dos LOOHs, produtos primários da oxidação. É ainda de notar, que este aumento foi mais acentuado e significativo no caso da exposição à concentração mais baixa de Ag-NPs. No entanto, é bastante provável que esta observação resulte da degradação dos LOOHs em produtos de oxidação secundários. Isto é, os maiores

teores de LOOHs medidos em amostras expostas a 10 µg/mL de Ag-NPs não deverão indicar maior oxidação da PLPC a esta concentração, mas sim que ocorreu uma maior degradação de LOOHs à concentração de 40 µg/mL, resultante de oxidação mais extensa, o que é concordante com os valores de $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$ obtidos.

III.2.2. Efeito das Ag-NPs PEG30

À semelhança do observado para as Cit30, para as PEG30 também se observam diferenças significativas nos valores $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$ na ausência de H₂O₂ (Figura

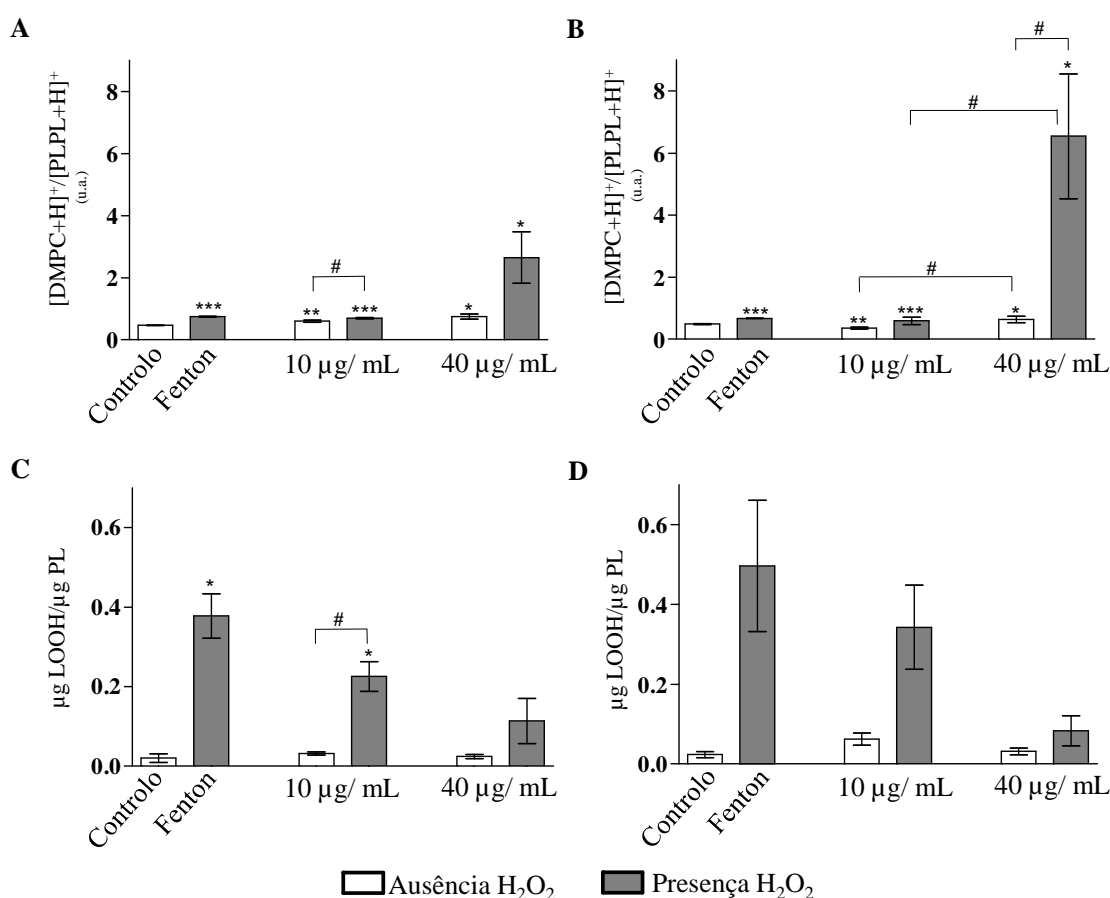


Figura III.6. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs de 30 nm revestidas com citrato (Cit30). Razão entre as abundâncias relativas dos iões $[DMPC+H]^+$ e $[PLPC+H]^+$ observados nos espectros de MALDI-MS dos extratos obtidos das misturas reacionais resultante da incubação de lipossomas com Cit30 após 24 horas (A) e 72 horas (B). Quantificação do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) utilizando o método de FOX II após a incubação de 24 horas (C) e 72 horas (D) de lipossomas com Cit30. Significância estatística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$ (os asteriscos (*) referem-se à comparação da respectiva condição com o controlo e os cardinais (#) entre as condições assinaladas).

Tabela III.1. Efeito de Ag-NPs na peroxidação lipídica. Valores da razão entre as abundâncias relativas dos íons [DMPC+H]⁺ e [PLPC+H]⁺ (íão *m/z* 678.6 e íão *m/z* 758.6) (A) e do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOHs) (B).

A		Razão <i>m/z</i> (678/758) (u.a)				
		24 horas		72 horas		
		Cit30	PEG30	PEG10	Cit30	PEG10
10 µg/mL	Ausência H ₂ O ₂	0.60 ± 0.03 ^b	0.51 ± 0.05	0.47 ± 0.02	0.35 ± 0.03 ^b	0.61 ± 0.02 ^b
	Presença H ₂ O ₂	0.69 ± 0.02 ^b	5.08 ± 0.17 ^c	0.74 ± 0.08 ^a	0.59 ± 0.12 ^c	17.02 ± 1.14 ^c
40 µg/mL	Ausência H ₂ O ₂	0.75 ± 0.08 ^a	0.63 ± 0.06 ^a	0.48 ± 0.01	0.64 ± 0.10 ^a	0.73 ± 0.06 ^b
	Presença H ₂ O ₂	2.65 ± 0.83 ^a	0.50 ± 0.04	1.15 ± 0.10 ^c	6.54 ± 2.01 ^a	0.58 ± 0.02 ^a
Controlo		0.47 ± 0.01		0.49 ± 0.02		

B		Hidroperóxidos lipídicos (µg LOOH/ µg PL)				
		24 horas		72 horas		
		Cit30	PEG30	PEG10	Cit30	PEG10
10 µg/mL	Ausência H ₂ O ₂	0.032 ± 0.004	0.069 ± 0.040	0.034 ± 0.007	0.063 ± 0.016	0.209 ± 0.107
	Presença H ₂ O ₂	0.226 ± 0.038 ^a	0.241 ± 0.029 ^a	0.644 ± 0.321	0.343 ± 0.106	0.271 ± 0.012 ^b
40 µg/mL	Ausência H ₂ O ₂	0.024 ± 0.005	0.034 ± 0.010	0.008 ± 0.002	0.032 ± 0.009	0.023 ± 0.008
	Presença H ₂ O ₂	0.114 ± 0.057	0.052 ± 0.003	0.189 ± 0.150	0.083 ± 0.038	0.056 ± 0.016
Controlo		0.020 ± 0.011		0.024 ± 0.008		

Significância estatística: ^a P < 0.05; ^b P < 0.01; ^c P < 0.001 (comparação da respetiva condição com o controlo)

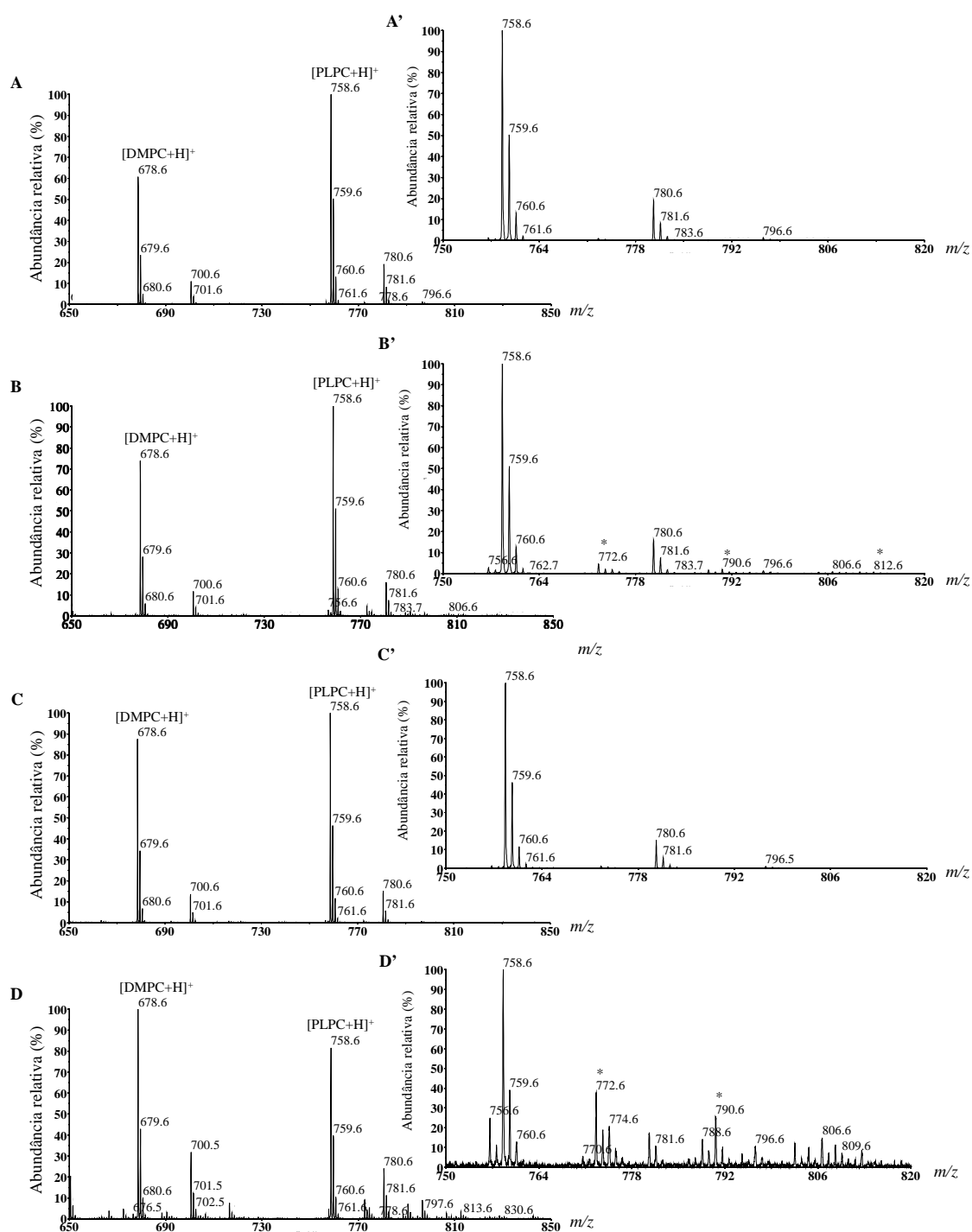


Figura III.7. Espectros de MALDI-MS obtidos para as fases orgânicas resultantes da incubação de lipossomas com Cit30 na ausência e na presença de H_2O_2 durante 24 horas. Incubação de: A – lipossomas + 10 $\mu\text{g/mL}$ de Cit30; B - lipossomas + 10 $\mu\text{g/mL}$ de Cit30 + H_2O_2 (50 mM); C - lipossomas + 40 $\mu\text{g/mL}$ de Cit30; D - + lipossomas + 40 $\mu\text{g/mL}$ de Cit30 + H_2O_2 (50 mM). As alíneas (') representam ampliações do respectivo espectro, e os asteriscos (*) representam os produtos de oxidação da PLPC: [PLPC+O+H]⁺, [PLPC+2O+H]⁺ e [PLPC+2O+Na]⁺ (iões de m/z 774.6, 790.6 e 812.6, respetivamente).

III.8.A,B). Por exemplo, às 72 horas registou-se um aumento nos valores $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ para de 0.61 ± 0.02 e 0.73 ± 0.06 , nas amostras expostas a Ag-NPs PEG30 nas concentrações de 10 e 40 $\mu\text{g/mL}$, respetivamente (Tabela III.1.). No entanto, apesar de valores significativamente diferentes do controlo, estes valores não deverão indicar oxidação da PLPC, visto que nos espectros de MALDI-MS não foi possível identificar quaisquer produtos de oxidação. Para mais, a quantificação de LOOH não revelou valores significativamente diferentes do controlo, onde não ocorreu oxidação. Ainda relativamente à quantificação de LOOH nas reações realizadas na ausência de H_2O_2 , é de notar um maior desvio associado às medições de alguns duplicados, de origem desconhecida, que, de qualquer forma, não se traduziu numa variação estatisticamente significativa relativamente ao controlo.

Na presença de H_2O_2 , as PEG30 provocaram um aumento pronunciado e estatisticamente significativo dos valores de $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ na menor concentração de Ag-NPs testada (Figura III.8.A,B): aumentos de 11 e 31x, às 24 e 72 horas respetivamente, em relação aos controlos (Tabela 6). No entanto, curiosamente, na concentração de Ag-NP mais elevada, este aumento foi inexistente para as 24 horas e ligeiro para as 72 horas. Contrariando a dependência esperada da extensão da oxidação em função da dose de NPs, como aliás se observou no caso das Cit30, este resultado apresenta-se como inesperado, não tendo sido encontrada, até ao momento, nenhuma explicação plausível que o justifique.

Os resultados da quantificação de LOOH também foram consistentes com a ocorrência de oxidação na presença de H_2O_2 e das NPs PEG30 à concentração mais baixa (Figura III.8.C,D). No entanto, às 72 horas, o aumento não foi tão acentuado como aquele visto com base na razão dos sinais de MS, muito provavelmente devido à decomposição dos LOOH em produtos secundários, tal como observado anteriormente. Na maior concentração (40 $\mu\text{g/mL}$ de PEG30), os valores de LOOH medidos foram próximos dos valores do controlo, tanto às 72 como às 24 horas, indicando novamente uma reduzida extensão na oxidação da PLPC, à semelhança do sugerido pelos valores de $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$.

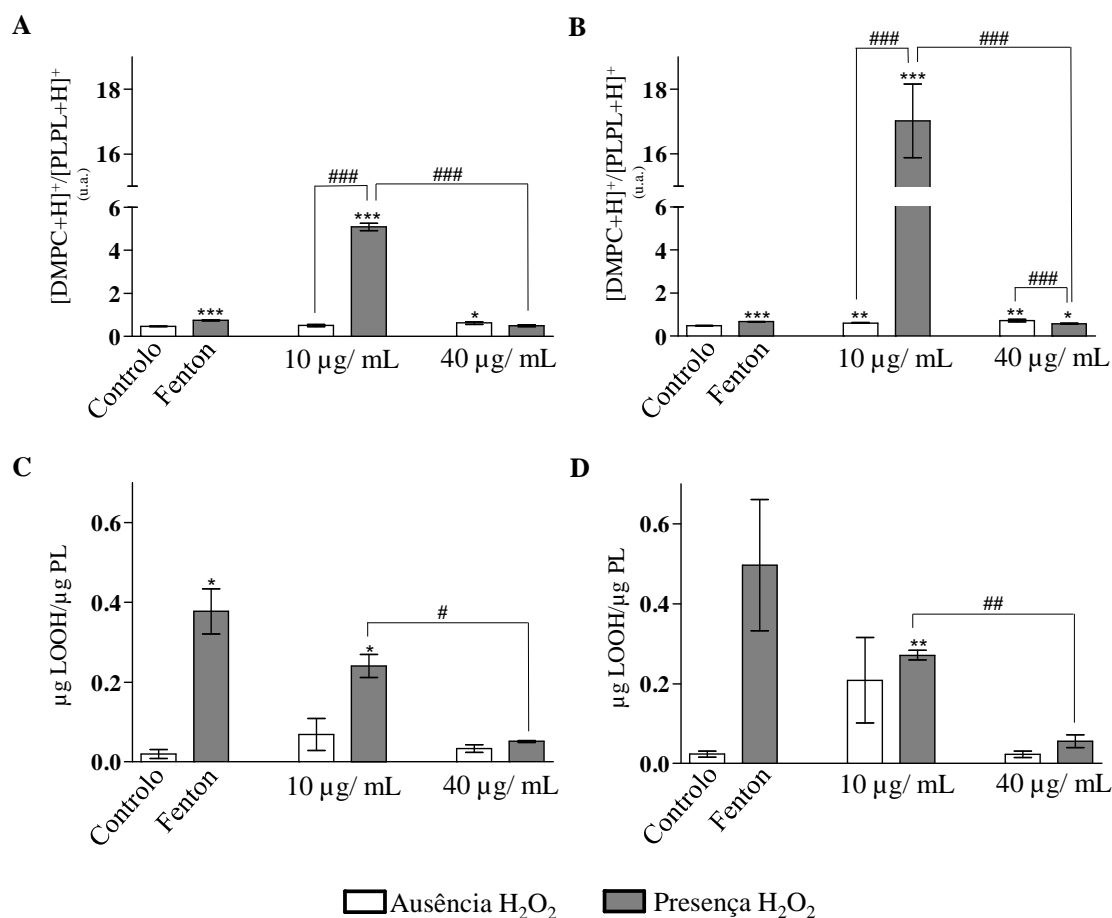


Figura III.8. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs de 30 nm revestidas com polietileno de glicol (PEG30). Razão entre as abundâncias relativas dos iões [DMPC+H]⁺ e [PLPC+H]⁺ observados nos espectros de MALDI-MS dos extratos obtidos das misturas reacionais resultante da incubação de lipossomas com PEG30 após 24 horas (A) e 72 horas (B). Quantificação do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) após a incubação de 24 horas (C) e 72 horas (D) de lipossomas com PEG30. Significância estatística: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (os asteriscos (*) referem-se à comparação da respectiva condição com o controlo e os cardinais (#) entre as condições assinaladas).

III.2.3. Efeito das Ag-NPs PEG10

No caso dos lipossomas expostos a Ag-NPs PEG10, na ausência de H₂O₂, a razão [DMPC+H]⁺/[PLPC+H]⁺ surgiu aumentada na amostra resultante da incubação durante 72h com a concentração de NPs mais elevada (Figura III.9.B). Interessantemente, o resultado do ensaio FOX também mostrou para esta condição um aumento significativo do teor de LOOH (Figura III.9.D). No entanto, a análise cuidada dos espectros de massa não permitiu identificar os iões correspondentes a produtos de oxidação da PLPC. Assim, tal como no

caso das outras NPs estudadas (Cit30 e PEG30), não se pode concluir de forma inequívoca que as NPs PEG10 terão capacidade de induzir oxidação lipídica mesmo na ausência de H_2O_2 .

Durante a incubação dos lipossomas com PEG10 na presença de H_2O_2 , observou-se uma diminuição da abundância relativa do íon molecular PLPC (m/z 758,6) relativamente ao íon DMPC (m/z 678,5), o que se traduziu num aumento significativo do valor da razão de $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ (Figura III.9.A,B). Em termos comparativos, a extensão da

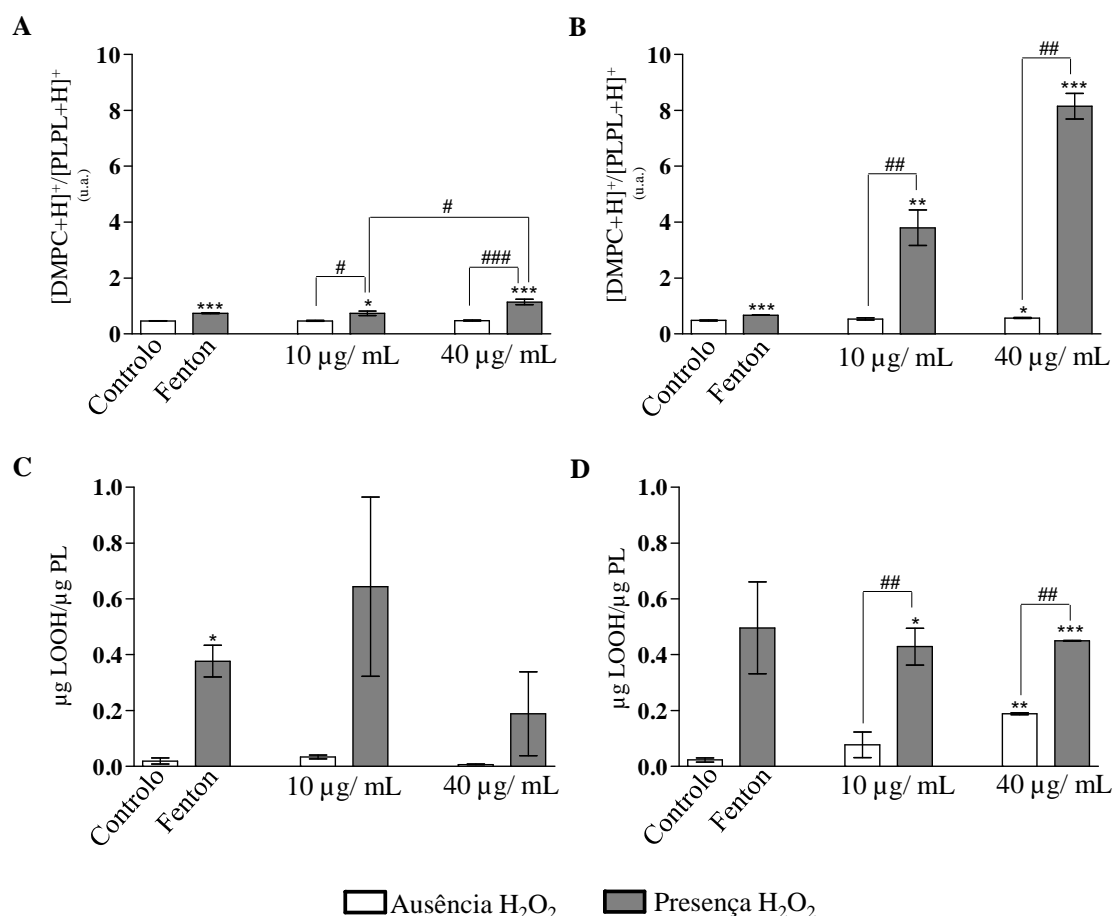


Figura III.9. Peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs de 10 nm revestidas com polietileno de glicol (PEG10). Razão entre as abundâncias relativas dos íões $[\text{DMPC}+\text{H}]^+$ e $[\text{PLPC}+\text{H}]^+$ observados nos espectros de MALDI-MS dos extratos obtidos das misturas reacionais resultante da incubação de lipossomas com PEG10 após 24 horas (A) e 72 horas (B). Quantificação do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) após a incubação de 24 horas (C) e 72 horas (D) de lipossomas com PEG10. Significância estatística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ (os asteriscos (*) referem-se à comparação da respetiva condição com o controlo e os cardinais (#) entre as condições assinaladas).

oxidação aumentou com a concentração de NPs e com o tempo de incubação, tendo-se registado um aumento de quase 20x em relação ao controlo para a concentração de 40 µg/mL às 72 horas.

Os resultados de FOX suportaram a ocorrência de oxidação na presença de H₂O₂, uma vez que foi visível o aumento do teor de LOOHs, embora, devido aos elevados erros associados a algumas medições, não se tenham atingido diferenças estatisticamente significativas para as 24h (Figura III.9.C). De resto, o efeito da possível decomposição dos LOOHs em produtos secundários continuou a estar patente, como mostram os menores teores registados a concentrações de NPs e/ou tempos de incubação mais elevados (Figura III.9.C,D).

III.2.4. Comparação das diferentes Ag-NPs testadas

A Figura III.10 mostra a comparação dos resultados de MS e de FOX obtidos para todas as condições avaliadas: três tipos de Ag-NPs (Cit30, PEG30 e PEG10), em duas concentrações e dois tempos de incubação, na ausência e na presença de H₂O₂.

Na ausência de H₂O₂, todas as NPs, em alguma dose ou tempo de incubação, provocaram um ligeiro aumento da razão [DMPC+H]⁺/[PLPC+H]⁺ medida nos espectros de MALDI-MS. No entanto, só no caso das PEG10 à concentração de 40 µg/mL e 72h de incubação é que esta variação foi acompanhada de um aumento significativo da quantidade de LOOH avaliada pelo método de FOX. Ainda assim, a ocorrência de oxidação da PLPC não pôde ser inequivocamente demonstrada nesta condição, pois não se conseguiram identificar produtos resultantes dessa oxidação nos espectros de massa.

Na presença de H₂O₂, observou-se uma dependência linear da extensão da oxidação da PLPC (avaliada por MS) em relação à concentração das NPs Cit30 e PEG10. As NPs PEG30 constituíram uma exceção a este respeito, já que os maiores aumentos da razão [DMPC+H]⁺/[PLPC+H]⁺ foram observados para a concentração mais baixa. Comparando a três NPs, a cada concentração e tempo de incubação verificou-se que: 1) às 24 horas, a uma dose mais baixa, as NPs Cit30 e PEG10 induziram uma variação semelhante na razão [DMPC+H]⁺/[PLPC+H]⁺ (inferior à provocada pelas PEG30); 2) às 24 horas, na dose mais alta, as Ag-NPs que provocaram oxidação mais extensa foram as Cit30, seguidas das PEG10 e finalmente das PEG30; 3) às 72 horas, na dose mais baixa, as NPs PEG30 tiveram um

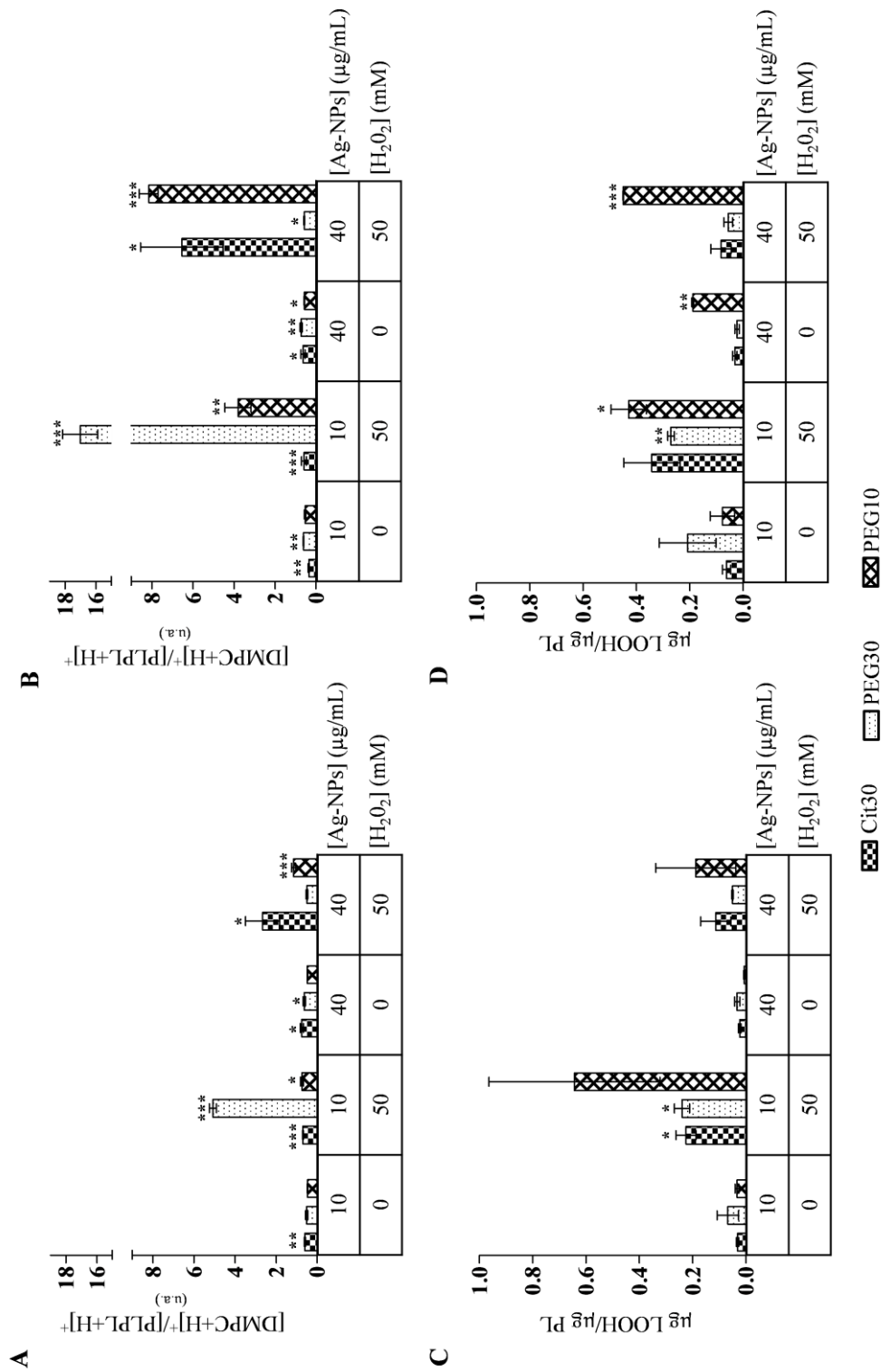


Figura III.10. Comparação das diferentes Ag-NPs testadas (Cit30 vs. PEG30 vs. PEG10) na peroxidação lipídica. Razão entre as abundâncias relativas dos íons [DMPC+H]⁺ e [PLPC+H]⁺ observados nos espectros de MALDI-MS dos extratos obtidos das misturas reacionais resultante da incubação de lipossomas com as diferentes Ag-NPs após 24 horas (A) e 72 horas (B) e quantificação do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) após a incubação de 24 horas (C) e 72 horas (D) de lipossomas com Cit30, PEG30 ou PEG10. Significância estatística: **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 (comparação entre as condições assinaladas e o controlo).

efeito muito pronunciado, seguindo-se as PEG10 e, com um efeito menor, as Cit30; 4) finalmente, às 72 horas, na dose mais alta, as Cit30 e as PEG10 causaram aumentos consideráveis na razão medida enquanto o efeito das PEG30 foi reduzido. Em suma, as diferentes NPs apresentaram efeitos que não variaram de forma linear com a concentração e o tempo de incubação, parecendo também não haver uma relação simples e direta entre o tamanho e o revestimento das Ag-NPs e a magnitude da oxidação provocada aos lipossomas de PCs.

Em termos da quantidade de LOOHs, produzidos na presença de H_2O_2 e dos três tipos de NPs, houve um fator de variabilidade acrescido que resultou da possível decomposição dos LOOH em produtos secundários, fazendo com as variações observadas, sobretudo no tempo e na dose mais elevados, pudessem subestimar a extensão da oxidação lipídica.

III.3. Discussão

De modo a continuar a desenvolver o enorme potencial das Ag-NPs em múltiplas aplicações, nomeadamente na área biomédica, é essencial fazer uma avaliação cuidada dos seus efeitos biológicos e compreender melhor as suas interações com as biomoléculas. Os lípidos são uma classe de biomoléculas com inúmeras funções importantes, algumas das quais se relacionam com o seu papel enquanto constituintes das membranas celulares. A oxidação dos lípidos membranares é um dos eventos que tipicamente resulta do desequilíbrio entre as espécies pró-oxidantes e antioxidantes (stress oxidativo), que tem sido identificado como uma das principais causas de toxicidade das Ag-NPs para as células humanas (34,38,41,42). O estudo da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs constitui, pois, um desafio importante no âmbito da avaliação das respostas biológicas a estas NPs. Neste capítulo, apresentou-se a aplicação de uma metodologia baseada em MS com vista à avaliação da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs num sistema lipossómico. Sendo amplamente reconhecidos como sistemas biomiméticos das membranas celulares, os lipossomas constituem um bom modelo para o estudo da oxidação lipídica já que, a partir de pequenas quantidades de padrões puros (de elevado valor comercial) se podem preparar sistemas de composição conhecida e de complexidade relativamente reduzida, facilitando a interpretação dos resultados.

Numa primeira fase do trabalho, investigou-se a afinidade das Ag-NPs em estudo (revestimento com citrato e com PEG) para a fase orgânica obtida após a extração dos lipossomas, de modo a escolher o método de MS mais adequado para a análise do extrato lipídico. Verificou-se que as Ag-NPs revestidas a PEG apresentavam grande afinidade para a fase orgânica, não tendo sido possível separá-las dessa fase com base em ultra-centrifugação. As Ag-NPs revestidas a citrato, embora com menor afinidade para a fase orgânica, também não se separaram completamente, tendo-se visualizado alguns agregados nos extratos lipídicos. Face a estes resultados, afastou-se a possibilidade de usar a técnica de ESI-MS, já que o contacto das Ag-NPs com a agulha/capilar de ESI poderia danificar o equipamento. Em alternativa, testou-se a aplicação da técnica de MALDI-MS, em que a possibilidade de interação das NPs presentes na amostra com o equipamento é muito menor. Tendo-se obtido resultados reproduzíveis e equivalentes aos de ESI-MS em amostras de controlo (lipossomas não oxidados e lipossomas oxidados pela reação de Fenton), avançou-se então para a aplicação desta metodologia à análise de peroxidação lipídica de lipossomas incubados na presença de Ag-NPs de diferentes tamanhos (10 e 30 nm) e revestimentos (citrato e PEG).

A peroxidação lipídica caracteriza-se pela abstração de um átomo de hidrogénio com consequente inserção de uma molécula de oxigénio em lípidos insaturados e ocorre segundo três mecanismos: auto-oxidação, foto-oxidação e oxidação enzimática (47). No caso do presente trabalho, a incubação dos lipossomas foi conduzida na ausência de lipogenases e ciclo-oxigenases, enzimas celulares capazes de oxidar lípidos, bem como na ausência de luz (equipamento de incubação tapado com uma estrutura em cartão). Desta forma, espera-se que o mecanismo responsável pela peroxidação lipídica observada seja o de auto-oxidação por via radicalar.

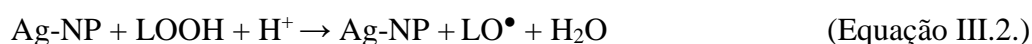
A ocorrência de oxidação da PLPC constituinte dos lipossomas foi testada na ausência e na presença de peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , uma das espécies reativas de oxigénio (ROS), presente nas células em condições fisiológicas e exacerbada em situações de inflamação (78).

Na ausência de H_2O_2 , a incubação dos lipossomas na presença de Ag-NPs resultou num pequeno aumento da razão dos iões $[DMPC+H]^+ / [PLPC+H]^+$ em algumas das condições, sugerindo oxidação da PLPC. De acordo com alguns estudos, há alguns fatores

que poderão estar na base de eventual oxidação provocada pelas Ag-NPs, mesmo na ausência de peróxido:

1) A libertação passiva de Ag^+ para o meio, em condições ácidas, ocorre com a formação de espécies reativas (25), que podem ser responsáveis pelo início da peroxidação lipídica.

2) Durante o processo de formação dos lipossomas, podem formar-se LOOHs (79). Logo, à semelhança do que foi recentemente proposto para NPs de Fe_3O_4 (80), é possível que as Ag-NPs possam atuar como peroxidases e decompor os LOOHs pré-existentes em radicais lipídicos, LO^\bullet , (Equação III.2.), que poderiam atuar como iniciadores da peroxidação lipídica. Nos ensaios realizados neste trabalho, os teores de LOOH pré-existentes nos lipossomas de controlo (sem NPs) eram de $0,020 \pm 0,011 \mu\text{g LOOH}/\mu\text{g PL}$ para as 24 horas e de $0,024 \pm 0,008 \mu\text{g LOOH}/\mu\text{g PL}$ para as 72 horas, o que são valores muito baixos.



Para melhor avaliar a possibilidade de ocorrência de oxidação da PLPC na ausência de H_2O_2 , analisaram-se também os resultados da quantificação de LOOH, obtidos em paralelo com os dados de MALDI-MS. Na maior parte das condições avaliadas, a sugestão de oxidação não foi confirmada pelo ensaio de FOX II. Apenas no caso das NPs PEG10 incubadas na concentração maior durante 72h se verificou um aumento significativo de LOOH a acompanhar o aumento da razão medida por MS. Ainda assim, a inspeção dos espectros de massa não permitiu identificar produtos de oxidação da PLPC, não se podendo concluir de forma inequívoca que ocorreu oxidação. A que se terá então devido o aumento na razão $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$? Uma explicação possível poderá ser a interação e/ou complexação entre Ag-NPs e lípidos polinsaturados (81), que se traduz numa redução da abundância relativa do íon $[\text{PLPC}+\text{H}]^+$. Neste sentido, seria de esperar a visualização destes complexos nos espectros de MALDI-MS, no entanto Ag-NPs são constituídas por inúmeros átomos de Ag (Mr. 107 g/mol), o que pode fazer com que os complexos Ag-NPs-lípidos não sejam visíveis na gama de m/z de aquisição.

O peróxido de hidrogénio é um ROS que, apesar de não ser das espécies mais reativas, funciona como sinalizador a nível celular. A sua concentração intracelular

fisiológica pode oscilar entre os 0,001 μM e os 0,5-0,7 μM , sendo que o gradiente presente na membrana plasmática permite que os níveis extracelulares de H_2O_2 atinjam valores 100 vezes superiores aos intracelulares (82). Dependendo dos organismos e de estímulos exógenos como situações de *stress* e inflamação, o aumento de produção H_2O_2 pode ocorrer com a ativação de importantes cascatas de sinalização (82). Como já referido no capítulo I, as Ag-NPs possuem diversas aplicações médicas, destacando-se pomadas e pensos para queimados que evitam a propagação de bactérias nas áreas afetadas. Essas áreas caracterizam-se por *stress* térmico (elevadas temperaturas) e inflamação, estando frequentemente exacerbada a produção de H_2O_2 , pelo que se torna relevante averiguar os efeitos das Ag-NPs na presença de H_2O_2 . Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que todas as Ag-NPs investigadas (Cit30, PEG30 e PEG10) provocaram oxidação da PLPC dos lipossomas modelo quando incubados durante 24 ou 72 horas na presença de peróxido. Em particular, observou-se um aumento significativo da razão $[\text{DMPC}+\text{H}]^+ / [\text{PLPC}+\text{H}]^+$ e detetaram-se iões correspondentes a produtos de oxidação da PLPC nos respetivos espectros de massa. A quantificação de LOOH corroborou os resultados, embora os efeitos fossem, em geral, menos notórios a concentrações e tempos superiores, provavelmente devido à degradação dos LOOH em produtos secundários. Observou-se ainda que, à exceção das PEG30, havia uma relação proporcional entre a concentração das NPs / tempo de incubação e a extensão da oxidação avaliada por MS. As variações em função do tamanho e revestimento das NPs não seguiram um padrão simples, sendo difícil estabelecer relações lineares entre cada uma destas variáveis e a extensão da oxidação.

Quanto ao possível mecanismo que estará na base da oxidação lipídica causada pelas Ag-NPs na presença de H_2O_2 , julga-se que poderá ser uma reação de tipo Fenton (Equação III.1.), em que a prata metálica (valência zero) é oxidada a prata iónica (+1), formando no processo um radical hidroxilo, HO^\bullet , que por sua vez poderá iniciar a peroxidação lipídica. Esta hipótese está de acordo com as observações de outros estudos reportados na literatura (72–77), sendo também importante referir que, por si só, o H_2O_2 não causa oxidação dos lipossomas (83).

Em suma, o estudo da peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em lipossomas revelou informação importante, contribuindo para a compreensão da interação entre diferentes tipos de Ag-NPs e as membranas celulares. Para além disso, a técnica de MALDI-

MS mostrou ser uma ferramenta muito útil para avaliar a peroxidação lipídica em modelos biomiméticos.

Capítulo IV – Alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs em queratinócitos humanos

Sendo a pele uma das principais vias de entrada de nanopartículas de prata (Ag-NPs) no organismo (2,33), é importante compreender a resposta biológica de células da pele à presença destas nanopartículas (NPs). No presente capítulo, apresentam-se os resultados da avaliação de alterações lipídicas induzidas por Ag-NPs em células da pele humana (queratinócitos da linha HaCaT). Em particular, avalia-se a possível ocorrência de peroxidação lipídica, um dos eventos associados ao *stress* oxidativo, e caracterizam-se possíveis alterações no perfil fosfolipídico destas células.

IV.1. Avaliação da peroxidação lipídica em queratinócitos

A peroxidação lipídica foi avaliada através da quantificação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH), produtos primários da oxidação de lípidos insaturados (44–46). Em alguns casos, foi ainda medido o teor de dienos conjugados (DC), também formados nos primeiros estágios da oxidação de lípidos (44,45). Estas determinações foram feitas em extratos lipídicos obtidos a partir de células que tinham sido expostas a Ag-NPs e de células controlo (sem exposição a Ag-NPs).

Na Figura IV.1 apresentam-se os resultados da quantificação de LOOH em células HaCaT controlo e células expostas a Ag-NPs revestidas com citrato e de diâmetro de 30 nm (Cit30), durante 24 e 48 horas. A concentração de NPs usada (10 µg/mL) foi selecionada como sendo a dose mais baixa que provoca um decréscimo significativo na viabilidade

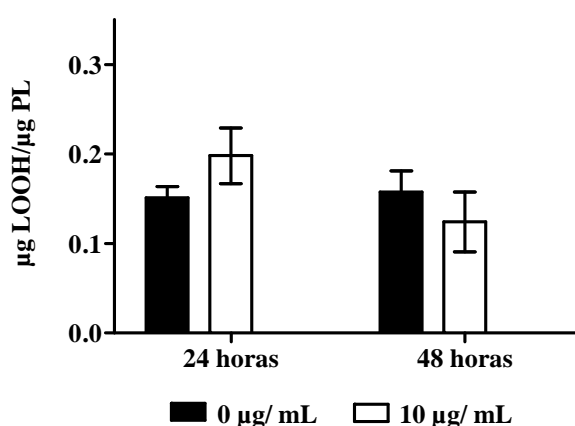


Figura IV.1. Teor de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em células HaCaT controlo (sem NPs) e células expostas a Ag-NPs revestidas a citrato (Cit30) durante 24 e 48 horas. Os valores médios e os respetivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de 3 réplicas biológicas.

celular (para cerca de 85%), de acordo com os resultados obtidos pelos colegas a trabalhar no projeto em que se inseriu a presente tese. Como indica a figura, o teor de LOOH foi maior nas células expostas a Cit30 durante 24 horas do que nas células controlo, embora não atingindo uma diferença estatisticamente significativa. Observou-se ainda que às 48 horas, os níveis de LOOH se encontram diminuídos, quer em relação às 24 horas, quer em relação às células controlo, possivelmente devido à degradação dos LOOHs em produtos secundários da oxidação lipídica, como explicado no capítulo I, seção I.2, e/ou devido à ativação de sistemas anti-oxidantes celulares.

Tendo em conta que a libertação de prata iónica a partir das Ag-NPs é frequentemente apontada como responsável pelo *stress* oxidativo e pela toxicidade associada a estas NPs, avaliou-se também o efeito dos iões Ag^+ nos níveis de LOOH das células HaCaT. Para este estudo, usaram-se duas concentrações: 1.2 $\mu\text{g/mL}$, correspondente ao IC_{50} (dose que provoca 50% de decréscimo na viabilidade celular) e 0.6 $\mu\text{g/mL}$, que provocou um ligeiro decréscimo da viabilidade celular (para cerca de 90%). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura IV.2. Depois de 24 horas na presença de AgNO_3 , as células apresentaram um aumento dos níveis de LOOH (embora não estatisticamente significativo), proporcional à concentração de Ag^+ . Às 48 horas, deixou de ser notório este aumento.

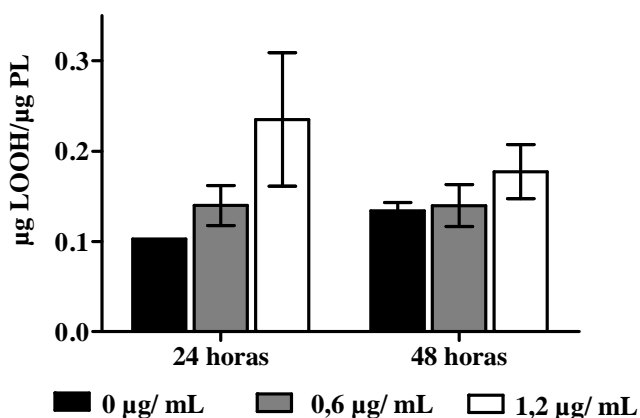


Figura IV.2. Teor de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em células HaCaT controlo e células expostas a AgNO_3 durante 24 e 48 horas. Os valores médios e os respetivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de 3 réplicas biológicas.

Comparando o efeito das NPs Cit30 e da prata iônica, verifica-se que o aumento relativo em relação ao controlo foi muito semelhante, cerca de 30%, quando se usaram doses de Ag-NPs e de Ag^+ indutoras de decréscimos semelhantes na viabilidade às 24 horas (concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ de Cit30 e de 0.6 $\mu\text{g/mL}$ de AgNO_3 , respetivamente).

Num outro ensaio, de modo a investigar a possível influência do tamanho e do revestimento das Ag-NPs nos níveis de peroxidação lipídica, compararam-se os teores de LOOH e de DC em células expostas durante 24 horas a NPs Cit30, PEG30 e PEG10. Os resultados estão apresentados na Figura IV.3. De acordo com os dados mostrados anteriormente, as NPs Cit30 provocaram um aumento significativo dos níveis de LOOH, às duas concentrações testadas (10 e 40 $\mu\text{g/mL}$, sendo esta última a dose correspondente ao

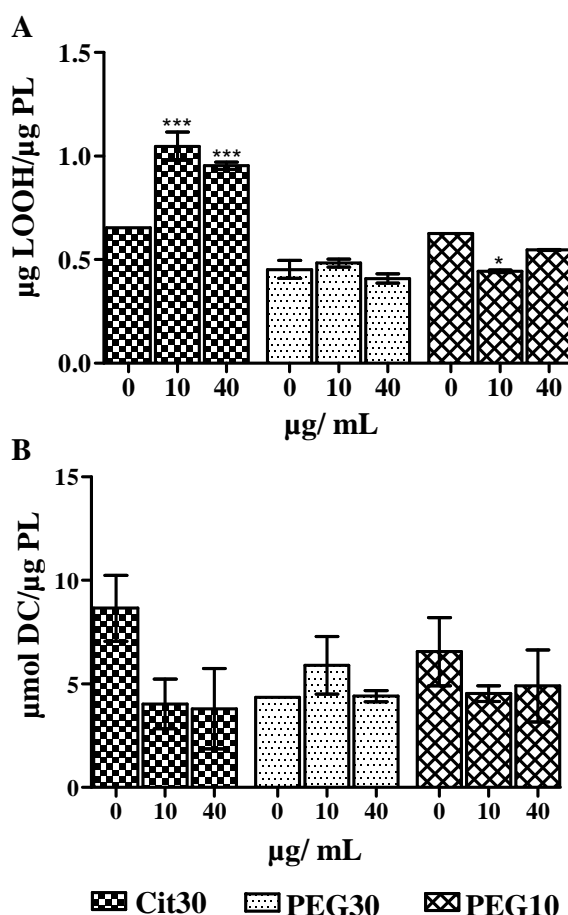


Figura IV.3. Teor de A) hidropéroxidos lipídicos (LOOH) e de B) dienos conjugados (DC) em células HaCaT controlo (sem NPs) e células expostas a Ag-NPs durante 24 horas (10 e 40 $\mu\text{g/mL}$). Os valores médios e os respetivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de uma *pool* de réplicas biológicas. Significância estatística: * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$ (comparação com o respetivo controlo)

IC₅₀) (Figura IV.3.A). Não se observou, no entanto, um aumento de LOOH com a concentração de NPs Cit30, como aconteceu no caso da prata iônica. Relativamente às NPs PEG30 e PEG10, os níveis de LOOH não variaram em relação ao controlo, exceto no caso da exposição a PEG10 na dose mais baixa (10 µg/mL), em que se notou uma diminuição (não esperada) em relação ao controlo. Deve, no entanto, ter-se em conta que estes resultados foram obtidos a partir de uma única amostra, devido a limitações na quantidade de extrato disponível. Assim, a diminuição observada poderá não ter relevância biológica. Relativamente aos níveis de DC, não se registaram diferenças significativas (Figura IV.3B).

A comparação entre NPs Cit30 e PEG30 foi ainda realizada uma outra vez num ensaio onde se analisaram 3 réplicas biológicas, isto é, 3 extratos lipídicos para cada condição. Os resultados, apresentados na Figura IV.4, corroboraram o efeito mais pronunciado das Cit30, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas.

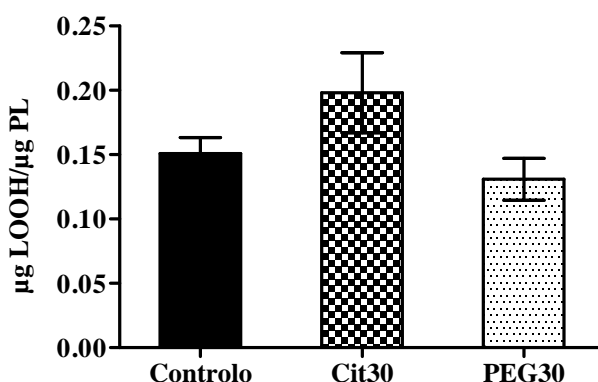


Figura IV.4 Teor de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em células HaCaT controlo (sem NPs) e células expostas a Ag-NPs Cit30 e PEG30 durante 24 horas. Os valores médios e os respetivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de 3 réplicas biológicas.

IV.2. Perfil fosfolipídico de queratinócitos expostos Ag-NPs

Com vista a caracterizar eventuais alterações no perfil lipídico dos extratos celulares em função da exposição a Ag-NPs, utilizou-se a cromatografia em camada fina (TLC) para separar as principais classes de fosfolípidos, seguida de quantificação de fósforo para estimar a contribuição relativa de cada classe.

Com base na análise de TLC de padrões, identificaram-se seis classes de fosfolípidos nos extratos de queratinócitos HaCaT: esfingomielinas (SM), fosfatidilcolinas (PC), fosfatidilinositois (PI), fosfatidilserinas (PS) fosfatidiletanolaminas (PE) e cardiolipinas (CL) (Figura IV.5). Depois, de modo a averiguar se havia diferenças neste perfil de fosfolípidos entre células controlo e células expostas a Ag-NPs, procedeu-se à determinação da quantidade relativa de cada classe relativamente aos fosfolípidos totais, nas diversas amostras estudadas.

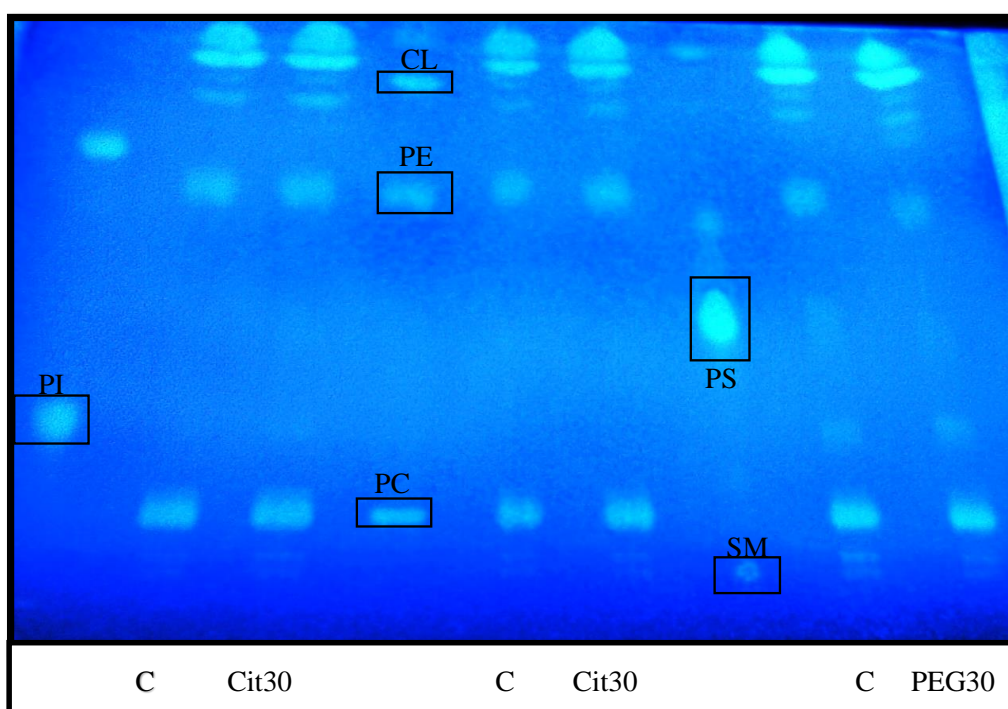


Figura IV.5. TLC representativo de extratos lípidos de células HaCaT sem exposição a AgNPs (C) e com exposição a 10 µg/mL de Ag-NPs revestidas com citrato (Cit30) e polietenoglicol (PEG30). A identificação das bandas recorreu aos padrões de fosfolípidos: SM – esfingomielinas; PC – fosfatidilcolinas; PI – fosfatidilinositois; PS – fosfatidilserinas; PE – fosfatidiletanolaminas e CL – cardiolipina.

A Figura IV.6 mostra os resultados obtidos para a exposição das células HaCaT a NPs Cit30 e PEG30 durante 24 horas, concentração de 10 µg/mL. As PCs são a classe mais abundante de fosfolípidos nas células HaCaT e a sua abundância relativa não pareceu alterar-se em função da exposição às Ag-NPs. As restantes classes apresentaram entre si proporções semelhantes e também não sofreram alterações pronunciadas ou significativas na presença das Ag-NPs. Notou-se apenas uma tendência para uma diminuição da abundância relativa

de CL nas células expostas a NPs Cit30 e um aumento de PS e uma diminuição de PE no caso das células expostas a PEG30 (Figura IV.6).

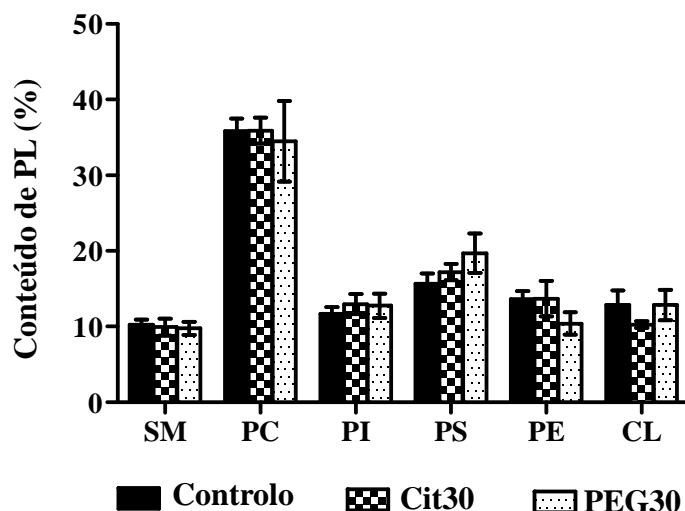


Figura IV.6. Conteúdo relativo de fosfolípidos (%) separados por cromatografia em camada fina (TLC) de extratos lipídicos de células HaCaT expostas a 10 µg/mL de Ag-NPs revestidas com citrato (Cit30) e polietenoglicol (PEG30) durante um período de incubação de 24 horas. Os valores médios e os respetivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de 3 réplicas biológicas.

Da exposição a NPs Cit30 durante 48 horas também não resultaram alterações significativas no perfil fosfolipídico (Figura IV.7), e as pequenas variações observadas mostraram tendências diferentes das sugeridas às 24 horas. Em particular, às 48 horas, as CL apresentaram um ligeiro aumento e as PI e PC uma ligeira diminuição. No entanto, há que salientar que as diferenças não foram significativas e que estes resultados carecem de confirmação num maior número de amostras e com doses de exposição mais elevadas.

O perfil lipídico de células HaCaT expostas a prata iónica foi também investigado, utilizando a abordagem já descrita. A Figura IV.8 mostra os resultados da quantificação das principais classes de fosfolípidos em extratos celulares resultantes da exposição a duas concentrações de AgNO₃ (0.6 e 1.2 µg/mL) durante 24 e 48 horas. Apesar de não se terem registado alterações estatisticamente significativas, notaram-se algumas tendências de variação. Por exemplo, às 24 horas, para a dose mais alta, houve um aumento de PE e uma diminuição de CL em relação ao controlo (Figura IV.8A), tendo-se registado variações

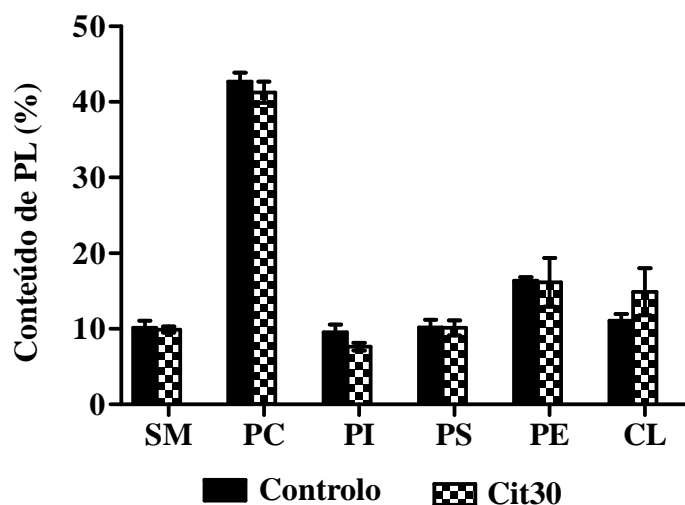


Figura IV.7. Conteúdo relativo de fosfolípidos (%) separados por cromatografia em camada fina (TLC) de extratos lipídicos de células HaCaT expostas a 10 $\mu\text{g/mL}$ de Ag-NPs revestidas com citrato (Cit30) durante 48 horas. Os valores médios e os respectivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de 3 réplicas biológicas.

semelhantes às 48 horas (Figura IV.8B). Por outro lado, PC e PI variaram mais quando as células foram expostas à dose mais baixa (PC com tendência para diminuir e PI para aumentar, relativamente ao controlo). Em geral, a maioria das classes apresentou variações semelhantes nos dois tempos de exposição, com exceção das PS, que se mostraram diminuídas relativamente ao controlo às 24 horas e ligeiramente aumentadas às 48 horas. Mais uma vez, face à variabilidade observada, é importante notar que será importante confirmar estes resultados num maior conjunto de amostras.

IV.3. Discussão

A avaliação das alterações lipídicas em células expostas a Ag-NPs poderá potencialmente fornecer informação importante sobre eventos bioquímicos associados à toxicidade das Ag-NPs, como a peroxidação lipídica, a degradação das membranas e os processos de sinalização e morte celular. No presente trabalho, a resposta de queratinócitos HaCaT a Ag-NPs foi caracterizada do ponto de vista da peroxidação lipídica e do perfil das principais classes de fosfolípidos.

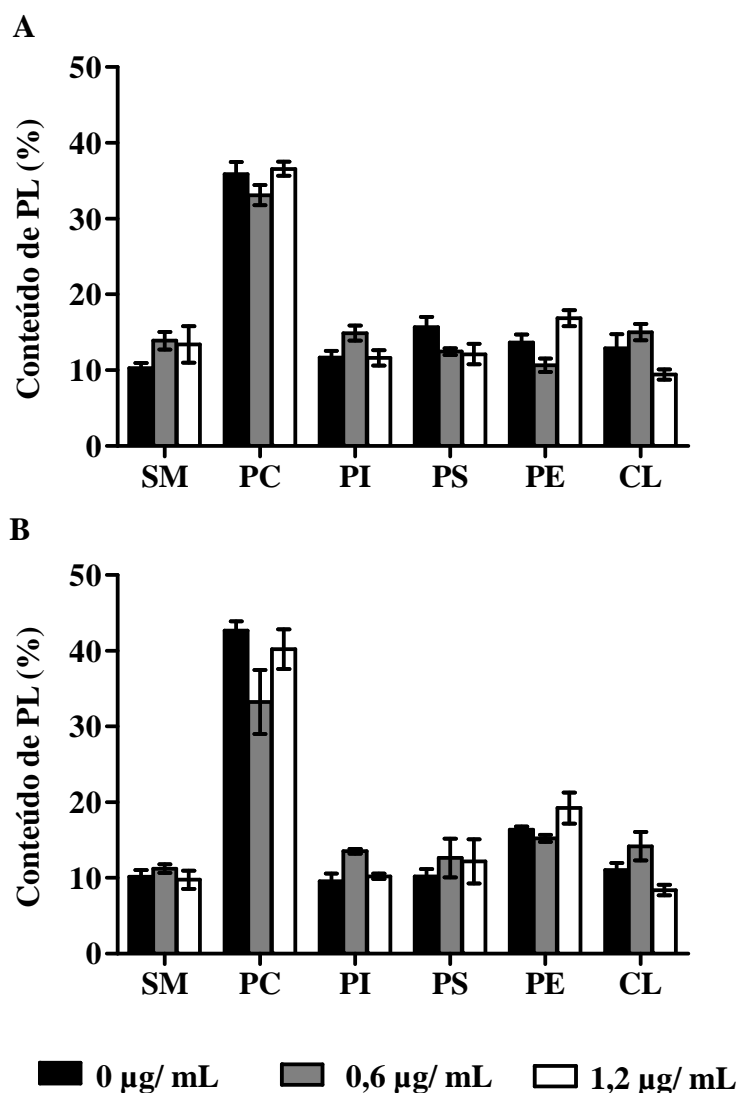


Figura IV.8. Conteúdo relativo de fosfolípidos (%) separados por cromatografia em camada fina dos extratos lipídicos totais de células HaCaT expostas a AgNO_3 (0, 0.6 e 1.2 $\mu\text{g/mL}$) durante os períodos de incubação: A) 24 horas e B) 48 horas Os valores médios e os respectivos erros padrão da média são apresentados para duplicados analíticos de 3 réplicas biológicas.

Ao nível da peroxidação lipídica, avaliada pela quantificação LOOHs, verificou-se que as Ag-NPs Cit30 induziam um aumento de LOOH, em consonância com o aumento dos níveis de outros produtos de oxidação lipídica, resultado da exposição de diferentes Ag-NPs, já reportado na literatura (5,59–62). Para além disso, este aumento foi comparável ao provocado pela prata iónica. Efetivamente, julga-se que tanto as Ag-NPs como a prata iónica poderão despoletar a produção excessiva de ROS (e a consequente oxidação de lípidos insaturados), através da interferência com a cadeia respiratória de transporte de eletrões

(41,84). No caso das outras Ag-NPs estudadas (PEG30 e PEG10), não se observaram diferenças em relação às células controlo. Uma vez que a principal diferença entre as NPs revestidas a PEG e as revestidas a citrato é a carga superficial (próxima de zero no primeiro caso e negativa no segundo), pode colocar-se a hipótese do maior efeito das NPs Cit30 se relacionar com a maior afinidade destas partículas para as membranas celulares (devido à maior percentagem de PC), facilitando a sua entrada na célula. Esta hipótese parece também ser suportada pelos resultados de viabilidade celular (não incluídos nesta tese) que mostraram maior toxicidade para as Ag-NPs revestidas a citrato do que para as Ag-NPs com igual tamanho nominal (30 nm) revestidas a PEG.

Em termos do perfil lipídico, avaliado pela quantificação relativa das principais classes de fosfolípidos separadas por TLC, as variações foram pouco pronunciadas e não significativas, quer mediante à exposição a Ag-NPs quer à prata iónica. Ainda assim, houve algumas tendências de variação que merecem ser mencionadas. Na presença de Ag-NPs Cit30 (24h de incubação) e de 1,2 µg/mL de Ag⁺, observou-se uma tendência para a diminuição da abundância relativa de cardiolipinas em relação às células controlo. Esta classe de fosfolípidos está quase exclusivamente presente na membrana interna das mitocôndrias e a diminuição dos seus níveis tem sido reportado em células e tecidos associados à apoptose (85). De facto, vários estudos têm reportado que a cardiolipina oxidada pode estar associada a disfunção mitocondrial associada a *stress* oxidativo (85,86). Uma outra tendência de variação foi a diminuição de PCs e/ou PEs em algumas das condições testadas, nomeadamente na presença de prata iónica (concentração 0.6 µg/mL) e das Ag-NPs Cit30 (tendência para diminuição de PCs ao fim de 48h de incubação) e PEG30 (tendência para diminuição de PEs ao fim de 24h de incubação). A diminuição de PCs e PEs em células expostas a Ag-NPs encontra-se reportada na literatura, tendo sido associada ao aumento dos lisofosfolípidos correspondentes (64). No caso do presente trabalho, estas tendências carecem de confirmação num maior número de amostras e, eventualmente, em condições de exposição a concentrações de NPs mais elevadas.

Capítulo V – Conclusões gerais e perspetivas futuras

O trabalho realizado no âmbito desta dissertação pretendeu avaliar a peroxidação lipídica em lipossomas e em queratinócitos da pele humana (células HaCaT), expostos a Ag-NPs de diferentes tamanhos e revestimentos. Foi ainda avaliado o efeito das Ag-NPs no perfil fosfolipídico da linha celular referida.

A peroxidação lipídica induzida por Ag-NPs em lipossomas, sistema biomimético de membranas celulares, foi avaliada através da quantificação de produtos de oxidação, nomeadamente hidroperóxidos lipídicos (LOOH), e das abundâncias relativas dos iões $[DMPC+H]^+$ e $[PLPC+H]^+$, medidas nos espectros de MALDI-MS. Na ausência de peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , as Ag-NPs testadas não induziram oxidação da PLPC. Na presença de H_2O_2 , uma das espécies reativas de oxigénio (ROS), normalmente produzida por via endógena e exacerbada em situações de *stress* ou inflamação, observou-se oxidação da PLPC nos lipossomas incubados com Ag-NPs. Esta oxidação foi confirmada pelo aumento dos níveis de LOOH, aumento da razão $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$ e identificação de produtos de oxidação nos espectros de MALDI-MS. No caso das Ag-NPs Cit30 e PEG10, verificou-se uma dependência diretamente proporcional entre a extensão de oxidação da PLPC (razão $[DMPC+H]^+/[PLPC+H]^+$) e a concentração das Ag-NPs. As NPs PEG30 constituíram uma exceção, tendo causado maior efeito oxidativo na concentração mais baixa. Quanto ao mecanismo do processo de oxidação, sugerimos que este se inicie por do via radical hidroxilo, HO^\bullet , produzido durante o processo oxidativo de Ag-NPs na presença de H_2O_2 . Na continuidade deste trabalho, seria interessante testar o efeito da concentração de H_2O_2 na extensão da oxidação, bem como variar a composição dos lipossomas usados como modelo biomimético.

A peroxidação lipídica (medida através da quantificação de LOOH) e as alterações do perfil fosfolipídico (monitorizadas através da quantificação relativa das classes separadas por TLC) foram avaliadas em queratinócitos da pele humana expostos a Ag-NPs. Apenas as NPs Cit30 produziram um aumento no teor de LOOH, à semelhança do efeito observado no caso da exposição a prata iónica. Em termos do perfil fosfolipídico, não houve alterações significativas, embora se tenham observado algumas tendências de variação como uma diminuição no conteúdo de cardiolipinas, no caso da exposição às Ag-NPs Cit30 (às 24 horas) e à prata iónica (1.2 $\mu\text{g/mL}$). Como trabalho futuro, sugere-se pois, a confirmação destes resultados num maior conjunto de amostras e em condições de exposição a concentrações de Ag-NPs mais elevadas. Para além disso, seria interessante aplicar a técnica

de espectrometria de massa à caracterização dos perfis lipídios das células expostas a Ag-NPs, de modo a obter informação mais detalhada sobre as alterações, estruturais e/ou quantitativas, em lípidos específicos.

Referências

1. Arora S, Rajwade JM, Paknikar KM. *Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour*. Toxicology and applied pharmacology. 2012;258(2):151–65.
2. Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson K, Lynch I. *Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications*. Materials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2013;6(6):2295–350.
3. You C, Han C, Wang X, Zheng Y, Li Q, Sun H. *The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity*. Molecular biology reports. 2012;39(9):9193–201.
4. Chernousova S, Epple M. *Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal*. Angewandte Chemie International Edition. Wiley-VCH Verlag; 2013;52(6):1636–53.
5. Liu P, Guan R, Ye X, Jiang J, Liu M, Chen X. *Toxicity of nano- and micro-sized silver particles in human hepatocyte cell line L02*. Journal of Physics: Conference Series. IOP Publishing; 2011;304(1):012036.
6. Prabhu S, Poullose E. *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. International Nano Letters. Springer-Verlag; 2012;2(1):1–10.
7. Haase A, Tentschert J, Jungnickel H, Graf P, Manton A, Draude F, Plendi J, Goets ME, Galla S, Mašić A, Thuenemann AF, Taubert A, Arlinghaus HF, Luch A. . *Toxicity of silver nanoparticles in human macrophages: uptake, intracellular distribution and cellular responses*. Journal of Physics: Conference Series. 2011;304(1):12030.
8. Duarte I, Trindade T. *Nanopartículas inorgânicas : novos materiais em biomedicina*. TecnoHospital, 2013; 59:26-30
9. Ahamed M, Khan MA, Siddiqui MK, AlSalhi M, Alrokayan S. *Green synthesis, characterization and evaluation of biocompatibility of silver nanoparticles*. Physica E Low-dimensional Systems and Nanostructures. 2011;43(6):1266.
10. Prabhu S, Poullose EK. *Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects*. International Nano Letters. Springer; 2012;2(1):32.
11. Iravani S, Korbekandi H. *Silver Nanoparticles, The Delivery of Nanoparticles*, Dr. Abbass A. Hashim (Ed.), ISBN: 978-953-51-0615-9, InTech; 2012.
12. Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IR de, Mahmoudi M. *Antibacterial properties of nanoparticles*. Trends in Biotechnology. 2012;30(10):499–511.
13. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Yacaman MJ. *The bactericidal effect of silver nanoparticles*. Nanotechnology. 2005;16(10):2346–53.

14. Marambio-Jones C, Hoek EV. *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research. Springer Netherlands; 2010;12(5):1531–51.
15. Abou El-Nour KMM, Eftaiha A, Al-Warthan A, Ammar RAA. *Synthesis and applications of silver nanoparticles*. Arabian Journal of Chemistry. 2010;3(3):135–40.
16. Sajanalal PR, Sreeprasad TS, Samal AK, Pradeep T. *Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions*. Nano Reviews. 2011.
17. P.Prema. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*. Carpi A, editor. InTech; 2011.
18. Jain PK, Huang X, El-Sayed IH, El-Sayed MA. *Review of Some Interesting Surface Plasmon Resonance-enhanced Properties of Noble Metal Nanoparticles and Their Applications to Biosystems*. Plasmonics. 2007;2(3):107–18.
19. Rivera VAG, Ferri FA, Jr. EM. *Localized Surface Plasmon Resonances: Noble Metal Nanoparticle Interaction with Rare-Earth Ions*. Plasmonics - Principles and Applications.
20. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. *Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles*. Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids. American Chemical Society; 2012;28(2):1095–104.
21. Egorova EM. *Biological Effects of Silver Nanoparticles*. pp. 221-258. Available from:https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=19899&osCsid=b9bc342e16028bf3fefe643172c2bbb9
22. Liu W, Zhou Q, Liu J, Fu J, Liu S, Jiang G. *Environmental and biological influences on the stability of silver nanoparticles*. Chinese Science Bulletin. 2011;56(19):2009–15.
23. Loza K, Diendorf J, Sengstock C, Ruiz-Gonzalez L, Gonzalez-Calbet JM, Eppele M. *The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media*. Journal of Materials Chemistry B. The Royal Society of Chemistry; 2014;2(12):1634.
24. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. *Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle*. Journal of nanobiotechnology. 2013;11(1):26.
25. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH. *Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces*. ACS Nano. American Chemical Society; 2010;4(11):6903–13.
26. Liu J, Hurt RH. *Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids*. Environmental Science & Technology. American Chemical Society; 2010;44(6):2169–75.

-
27. Bartłomiejczyk T, Lankoff A, Kruszewski M, Szumiel I. *Silver nanoparticles -- allies or adversaries?*. Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM. 2013;20(1):48–54.
 28. Marambio-Jones C, Hoek EM V. *A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment*. Journal of Nanoparticle Research. 2010;12(5):1531–51.
 29. Wong KKY, Liu X. *Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine?*. MedChemComm. Royal Society of Chemistry; 2010;1(2):125.
 30. Hajipour MJ, Fromm KM, Ashkarran AA, Jimenez de Aberasturi D, de Larramendi IR, Mahmoudi M. *Antibacterial properties of nanoparticles*. Trends in biotechnology. 2012;30(10):499–511.
 31. Xiu Z, Zhang Q, Puppala HL, Colvin VL, Alvarez PJJ. *Negligible Particle-Specific Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles*. Nano Letters. American Chemical Society; 2012;12(8):4271–5.
 32. Li WR, Xie XB, Shi QS, Zeng HY, Ou-Yang YS, Chen YB. *Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology. 2010;85(4):1115–22.
 33. Kruszewski M, Brzoska K, Brunborg G, Asare N, Dobrzyńska M, Refsnes M. *Chapter Five – Toxicity of Silver Nanomaterials in Higher Eukaryotes*. Advances in Molecular Toxicology. 2011. p. 179–218.
 34. Asharani PV, Wu YL, Gong Z, Valiyaveetil S. *Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models*. Nanotechnology. 2008;19(25):255102.
 35. Dawson KA, Salvati A, Lynch I. *Nanotoxicology: Nanoparticles reconstruct lipids*. Nature Nanotechnology. 2009. p. 84–5.
 36. Umh HN, Kim Y. *Simple analysis for interaction between nanoparticles and fluorescence vesicle as a biomimetic cell for toxicological studies*. Bulletin of the Korean Chemical Society. 2012;33(12):3998–4002.
 37. Park SH, Oh SG, Mun JY, Han SS. *Effects of silver nanoparticles on the fluidity of bilayer in phospholipid liposome*. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces. 2005;44(2-3):117–22.
 38. Eom H-J, Choi J. *p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells*. Environmental science & technology. 2010;44(21):8337–42.
 39. Kim S, Ryu DY. *Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues*. Journal of Applied Toxicology. 2013;33(2):78–89.
-

40. Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S. *Nanoparticles: molecular targets and cell signalling*. Archives of toxicology. 2011;85(7):733–41.
41. Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ. *The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells*. Toxicology Letters. 2008;179(3):130–9.
42. Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, Aueviriyavit S, Phummiratch D, Maniratanachote R. *Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways*. Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA. 2013;27(1):330–8.
43. Kohen R, Nyska A. *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicologic pathology. 30(6):620–50.
44. Marisa Repetto, Jimena Semprine and Alberto Boveris (2012). *Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination, Lipid Peroxidation*, Dr. Angel Catala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech; 2012.
45. Claudia Borza, Danina Muntean, Cristina Dehelean, Germaine Săvoiu, Corina Șerban, Georgeta Simu, Mihaela Andoni, Marius Butur and Simona Drăgan. *Oxidative Stress and Lipid Peroxidation – A Lipid Metabolism Dysfunction, Lipid Metabolism*, Prof. Rodrigo Valenzuela Baez (Ed.). ISBN: 978-953-51-0944-0, InTech; 2013.
46. Catalá A. *Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions*. Chemistry and physics of lipids. 2009;157(1):1–11.
47. El-Beltagi HS, Mohamed HI. *Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2013. p. 44–57.
48. Halliwell B, Chirico S. *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. The American journal of clinical nutrition. 1993;57(5 Suppl):715S – 724S; discussion 724S – 725S.
49. El-Aal H. *Lipid Peroxidation End-Products as a Key of Oxidative Stress: Effect of Antioxidant on Their Production and Transfer of Free Radicals, Lipid Peroxidation*, Dr. Angel Catala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech; 2012.
50. Pillon NP, Soulage CO. *Lipid Peroxidation by-Products and the Metabolic Syndrome, Lipid Peroxidation*, Dr. Angel Catala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech; 2012.
51. Van Meer G, Kroon AIPM. *Lipid map of the mammalian cell*. Journal of cell science. 2011;124(Pt 1):5–8.

-
52. Devasagayam TPA, Boloor KK, Ramasarma T. *Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits*. Indian journal of biochemistry & biophysics. 2003;40(5):300–8.
 53. Shahidi F, editor. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
 54. Palmieri B, Sblendorio V. *Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I*. European review for medical and pharmacological sciences. 11(5):309–42.
 55. Spener F, Lagarde M, G  lo  n A, Record M. *Editorial: What is lipidomics?*. European Journal of Lipid Science and Technology. 2003;105(9):481–2.
 56. Domingues MRM, Reis A, Domingues P. *Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids*. Chemistry and physics of lipids. 2008;156(1-2):1–12.
 57. Kaurinovic B, Popovic M. *Liposomes as a Tool to Study Lipid Peroxidation, Lipid Peroxidation*, Dr. Angel Catala (Ed.), ISBN: 978-953-51-0716-3, InTech, 2012;
 58. Chen R, Choudhary P, Schurr RN, Bhattacharya P, Brown JM, Ke PC. *Interaction of lipid vesicle with silver nanoparticle-serum albumin protein corona*. Applied physics letters. 2012;100(1).
 59. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. *Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells*. Toxicology and applied pharmacology. 2009;236(3):310–8.
 60. Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. *Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies*. Toxicology letters. 2008;179(2):93–100.
 61. Powers CM, Badireddy AR, Ryde IT, Seidler FJ, Slotkin TA. *Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition*. Environmental health perspectives. 2011;119(1):37–44.
 62. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Hyun JW. *Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis*. Toxicology letters. 2011;201(1):92–100.
 63. Tentschert J, Draude F, Jungnickel H, Haase A, Manton A, Arlinghaus HF. *TOF-SIMS analysis of cell membrane changes in functional impaired human macrophages upon nanosilver treatment*. Surface and Interface Analysis. 2013;45(1):483–5.
 64. Haase A, Arlinghaus HF, Tentschert J, Jungnickel H, Graf P, Luch A. *Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses*. ACS nano. American Chemical Society; 2011;5(4):3059–68.
-

65. Wolff SP. *Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides*. Methods in enzymology. Elsevier; 233:182–9.
66. Teng Q, Huang W, Collette TW, Ekman DR, Tan C. *A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics*. Metabolomics. 2008;5(2):199–208.
67. Bartlett EM, Lewis DH. *Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate*. Analytical Biochemistry. 1970;36(1):159–67.
68. O'Connor Butler ES, Mazerik J, Cruiff J, Sherwani S, Weis B, Parinandi N. *Lipoxygenase-Catalyzed Phospholipid Peroxidation: Preparation, Purification, and Characterization of Phosphatidylinositol Peroxides*. In: Uppu RM, Murthy SN, Pryor WA, Parinandi NL, editors. Free Radicals and Antioxidant Protocols SE - 23. Humana Press; 2010. p. 387–401.
69. Palaniappan PL, Pramod KS. *FTIR study of the effect of nTiO₂ on the biochemical constituents of gill tissues of Zebrafish (Danio rerio)*. Food and chemical toxicology : 2010;48(8-9):2337–43.
70. Adachi J, Asano M, Yoshioka N, Nushida H, Ueno Y. *Analysis of phosphatidylcholine oxidation products in human plasma using quadrupole time-of-flight mass spectrometry*. The Kobe journal of medical sciences. 2006;52(5):127–40.
71. Reis A, Domingues P, Ferrer-Correia AJ V, Domingues MRM. *Fragmentation study of short-chain products derived from oxidation of diacylphosphatidylcholines by electrospray tandem mass spectrometry: identification of novel short-chain products*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2004;18(23):2849–58.
72. He D, Jones AM, Garg S, Pham AN, Waite TD. *Silver Nanoparticle–Reactive Oxygen Species Interactions: Application of a Charging–Discharging Model*. The Journal of Physical Chemistry C. American Chemical Society; 2011;115(13):5461–8.
73. He D, Miller CJ, Waite TD. *Fenton-like zero-valent silver nanoparticle-mediated hydroxyl radical production*. Journal of Catalysis. 2014;317:198–205.
74. He D, Garg S, Waite TD. *H₂O₂-mediated oxidation of zero-valent silver and resultant interactions among silver nanoparticles, silver ions, and reactive oxygen species*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids. 2012;28(27):10266–75.
75. He D, Dorantes-Aranda JJ, Waite TD. *Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects*. Environ Sci Technol. 2012;8731–8.
76. Ho C-M, Yau SK-W, Lok C-N, So M-H, Che C-M. *Oxidative dissolution of silver nanoparticles by biologically relevant oxidants: a kinetic and mechanistic study*. Chemistry, an Asian journal. 2010;5(2):285–93.

-
77. Wang GL, Zhu XY, Dong YM, Jiao HJ, Wu XM, Li ZJ. *The pH-dependent interaction of silver nanoparticles and hydrogen peroxide: a new platform for visual detection of iodide with ultra-sensitivity*. Talanta. 2013;107:146–53.
 78. Wittmann C, Chockley P, Singh SK, Pase L, Lieschke GJ, Grabher C,. *Hydrogen peroxide in inflammation: Messenger, guide, and assassin*. Advances in Hematology. 2012.
 79. Tang L, Zhang Y, Qian Z, Shen X. *The mechanism of Fe(2+)-initiated lipid peroxidation in liposomes: the dual function of ferrous ions, the roles of the pre-existing lipid peroxides and the lipid peroxyl radical*. The Biochemical journal. 2000;352 Pt 1:27–36.
 80. Wang L, Min Y, Xu D, Yu F, Zhou W, Cuschieri A. *Membrane lipid peroxidation by the peroxidase-like activity of magnetite nanoparticles*. Chemical communications (Cambridge, England). The Royal Society of Chemistry; 2014;50(76):11147–50.
 81. Seal JR, Havrilla CM, Porter NA, Hachey DL. *Analysis of unsaturated compounds by Ag⁺ coordination ionspray mass spectrometry: studies of the formation of the Ag⁺/lipid complex*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2003;14(8):872–80.
 82. Stone JR, Yang S. *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxidants & redox signaling. 8(3-4):243–70.
 83. Repetto MG, Ferrarotti NF, Boveris A. *The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation*. Archives of toxicology. 2010;84(4):255–62.
 84. AshaRani P V, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveetil S. *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells*. ACS nano. American Chemical Society; 2009;3(2):279–90.
 85. Gonzalvez F, Gottlieb E. *Cardiolipin: setting the beat of apoptosis*. Apoptosis : an international journal on programmed cell death. 2007;12(5):877–85.
 86. Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang J, Fujii Y. *Oxidative lipidomics of apoptosis: redox catalytic interactions of cytochrome c with cardiolipin and phosphatidylserine*. Free radical biology & medicine. 2004;37(12):1963–85.